
MASTERARBEIT

Herr Dipl. Ing. (FH)
Steve Behrens

**Charakterisierung des
Zellwachstums von
Osteosarkomazellen auf ta-C
beschichteten und
mikrostrukturierten Werkstoffen**

Mittweida, 2012

MASTERARBEIT

Charakterisierung des Zellwachstums von Osteosarkomazellen auf ta-C beschichteten und mikrostrukturierten Werkstoffen

Autor:
**Herr Dipl. Ing.(FH)
Steve Behrens**

Studiengang:
Physikalische Technik

Seminargruppe:
PT09w1M

Erstprüfer:
Prof. Dr. rer. nat. Petra Radehaus

Zweitprüfer:
Prof. Dr. rer. nat. Steffen Weißmantel

Einreichung:
Mittweida, 31.07.2012

Verteidigung/Bewertung:
Mittweida, 2012

Bibliografische Beschreibung:

Behrens, Steve:

Charakterisierung des Zellwachstums von Osteosarkomazellen auf ta-C beschichteten und mikrostrukturierten Werkstoffen. - 2012 – 4, 77, 8 S.

Mittweida, Hochschule Mittweida,

Fakultät Mathematik/Naturwissenschaften/Informatik, Masterarbeit, 2012

Referat:

In der vorliegenden Arbeit werden SAOS-2 Zellen, welche auf mikrostrukturierten und ta-C beschichteten Objektträgern adhärierten, anhand von Fluoreszenzmessungen untersucht. Die Identifizierung möglicher Einflussfaktoren auf die Proliferation und Adhäsion der Zelllinie durch mikrostrukturierte und teilbeschichtete Glasobjektträger wird unter Verwendung des Cell Titer Blue Assays und der digitalen Bildverarbeitungssoftware CellProfiler untersucht.

INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	III
TABELLENVERZEICHNIS.....	IV
ANLAGENVERZEICHNIS.....	IV
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	IV
1 EINLEITUNG.....	1
2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN	3
2.1 ZELLULÄRE PROZESSE	3
2.1.1 Proliferation (Zellzyklus / Zellteilung).....	3
2.1.2 Regulation des Zellzyklus.....	4
2.2 STRUKTUR UND AUFBAU NATÜRLICHER GEWEBE.....	5
2.2.1 extrazelluläre Matrix und Zelladhäsion.....	5
2.2.2 Wechselwirkungen mit dem Trägersubstrat	7
2.2.3 Zell-Adhäsion und Wachstum auf Trägersubstraten.....	8
2.3 ZELLKULTUREN	10
2.4 DÜNNSCHICHTTECHNOLOGIE	10
2.4.1 Amorpher Kohlenstoff	11
2.4.2 Herstellung von ta-C Schichten.....	13
2.5 BIOKOMPATIBILITÄT VON DLC- UND TA-C - SCHICHTEN	16
2.6 FLUORESZENZ	18
3 MATERIAL UND METHODEN	19
3.1 MATERIALIEN	19
3.1.1 Chemikalien:.....	19
3.1.2 Medien:	19
3.1.3 Material:.....	20
3.1.4 Geräte:	20
3.1.5 Zelllinie SAOS-2.....	20
3.1.6 Glasobjektträger	21
3.1.7 Thoma-Kammer.....	23
3.1.8 Cell Titer Blue – Cell Viability Assay	24
3.1.9 Fluoreszenzphotometer FluoroskanFL.....	24
3.1.10 Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M der Firma Carl Zeiss	25
3.1.11 Fluoreszenzfärbung.....	26
3.1.12 Software CellProfiler	27
3.2 UNTERSUCHUNGSMETHODEN	29

3.2.1	Experimente mit dem Cell Titer Blue Assay	31
3.2.2	Experiment mit der Software CellProfiler	34
4	ERGEBNISSE	36
4.1	UNTERSUCHUNGEN MIT DEM CELL TITER BLUE ASSAY	36
4.1.1	Erstellen der Standardkurve	36
4.1.2	Kultivierung auf strukturierten und / oder beschichteten Glasobjektträgern	39
4.2	UNTERSUCHUNGEN MIT DER SOFTWARE CELLPROFILER.....	46
5	DISKUSSION.....	55
5.1	CHARAKTERISIERUNG DER PROLIFERATION MIT DEM CELL TITER BLUE ASSAY.....	55
5.1.1	Standardkurve	55
5.1.2	SAOS-2 Kultivierung auf strukturierten und / oder beschichteten Glasobjektträgern	59
5.2	CHARAKTERISIERUNG DER PROLIFERATION MIT DER SOFTWARE CELLPOFILER	65
5.3	AUSBLICK	76
6	ZUSAMMENFASSUNG	77
	LITERATURVERZEICHNIS	V
	DANKSAGUNG	XI
	SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	XII

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 1: DARSTELLUNG DER EXTRAZELLULÄREN MATRIX	6
ABBILDUNG 2: AUSBREITUNG VON MAUS-FIBROBLASTEN AUF DECKGLAS	9
ABBILDUNG 3: KULTIVIERUNGSMETHODEN	10
ABBILDUNG 4: ATOMMODELL VON GRAPHIT- UND DIAMANTSTRUKTUR	12
ABBILDUNG 5: HEXAGONALE STRUKTUR GRAPHIT	13
ABBILDUNG 6: TETRAEDRISCHE ANORDNUNG KOHLENSTOFF IM DIAMANTGITTER,.....	13
ABBILDUNG 7: PLD VERFAHREN	14
ABBILDUNG 8: ABLATIONSPROZESS	15
ABBILDUNG 9: STRUKTURIERUNG DER OBJEKTTRÄGER.....	21
ABBILDUNG 10: MIKROSKOPAUFNAHMEN DER STRUKTUREN	22
ABBILDUNG 11: GRUPPENQUADRATE MIT DEN DAZUGEHÖRIGEN KLEINQUADRATEN	23
ABBILDUNG 12: STANDARDKURVE.....	38
ABBILDUNG 13: SAOS-2 ZELLEN FÜR STRUKTUR 1 UND STRUKTUR 2.....	40
ABBILDUNG 14: SAOS-2 ZELLEN FÜR STRUKTUR 3 UND KONTROLLE	42
ABBILDUNG 15: FLUORESZENZAUFNAHMEN LINIENSTRUKTUREN.....	43
ABBILDUNG 16: FLUORESZENZAUFNAHMEN RECHTECKSTRUKTUR	44
ABBILDUNG 17: FLUORESZENZAUFNAHMEN PUNKTSTRUKTUREN	44
ABBILDUNG 18: FLUORESZENZAUFNAHME KONTROLLE	45
ABBILDUNG 19: FLUORESZENZAUFNAHME VOR UND NACH ANALYSE MIT CELLPROFILER.....	47
ABBILDUNG 20: MAJORAXIS DER ZELLEN FÜR DIE STRUKTUR 1 UND STRUKTUR 2.....	50
ABBILDUNG 21: MAJORAXIS DER ZELLEN FÜR DIE STRUKTUR 3 UND KONTROLLE.....	53
ABBILDUNG 22: ZELLKONZENTRATION FÜR VERSCHIEDENE ADHÄSIONSFLÄCHEN.	VII

TABELLENVERZEICHNIS

TABELLE 1: STRUKTURIERUNGSPARAMETER DER GLASOBJEKTTRÄGER	22
TABELLE 2: VERTEILUNG DER STRUKTUREN IM 4-WELL NR. A	33
TABELLE 3: VERTEILUNG DER STRUKTUREN IM 4-WELL NR. B	33
TABELLE 4: ERGEBNISSE STRUKTUR 1 - LINIENSTRUKTUR (MAJORAXIS / MINORAXIS)	48
TABELLE 5: ERGEBNISSE STRUKTUR 2 - RECHTECKSTRUKTUR (MAJORAXIS / MINORAXIS)	49
TABELLE 6: ERGEBNISSE STRUKTUR 3 - PUNKTSTRUKTUR (MAJORAXIS / MINORAXIS)	51
TABELLE 7: ERGEBNISSE KONTROLLE (MAJORAXIS / MINORAXIS)	52
TABELLE 8: ERGEBNISSE FORMFAKTOR	X
TABELLE 9: ERGEBNISSE AREA	X

ANLAGENVERZEICHNIS

ANLAGE 1: ERGEBNISSE FLUORESZENZMESSUNG STANDARDKURVE	VII
ANLAGE 2: ERGEBNISSE STRUKTURIERTE UND TEILBESCHICHTETEN GLASOBJEKTTRÄGERN	VIII
ANLAGE 3: PIPELINE	IX
ANLAGE 4: ERGEBNISSE CELLPROFILER FÜR SEGMENTIERTE ZELLEN UND NUKLEI	X

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AREA	<i>durch Zellen oder Nuklei eingenommene Fläche</i>
BSA	<i>Bovines Serum Albumin</i>
CVD	<i>chemical vapour deposition</i>
DBV	<i>digitale Bilderverarbeitung</i>
DLC	<i>diamond like carbon</i>
DNA	<i>Desoxyribonukleinsäure</i>
DSMZ	<i>Deutsche Sammlung für Mikroorganismen</i>
ECM	<i>Extrazelluläre Matrix</i>
FF	<i>Formfaktor</i>
MajorAxis	<i>längste Achse der segmentierten Zelle</i>
MinorAxis	<i>kürzeste Achse der segmentierten Zelle</i>
PLD	<i>pulsed Laser Deposition</i>
PVD	<i>physical vapour deposition</i>
ta-C	<i>wasserstofffreie, amorphe Kohlenstoffschichten</i>

1 Einleitung

Die fortschreitende technische Entwicklung in den Bereichen der Medizintechnik und Biotechnologie ermöglicht den Einsatz von neuen diagnostischen Verfahren und Therapieansätzen. Um den neuen Anforderungen gerecht zu werden, müssen Materialwissenschaften, Biotechnologie und Medizintechnik zusammen geeignete Materialien und Verfahren entwickeln, mit denen Erkrankungen frühzeitig erkannt und mit entsprechenden Therapieverfahren positiv beeinflusst werden können.

Die Anwendung von nichtbiologischen Werkstoffen in Form von Implantaten, Sensoren und verwendeten Instrumenten ist in der Medizin in den letzten Jahren kontinuierlich angestiegen und bildet heutzutage eine bedeutende Grundlage der medizinischen Versorgung. Die Kombination aus nichtbiologischen Materialien mit biologischen Geweben stellt für Ingenieure sowie Produzenten eine besondere Herausforderung dar. Im Mittelpunkt jeder Untersuchung, steht die Verträglichkeit zwischen biologischem und technischem System. Die Grundfunktionen des Organismus dürfen durch die Applikation der modifizierten Werkstoffe nicht beeinträchtigt werden. Dies stellt somit eine der wichtigsten Eigenschaften biokompatibler Werkstoffe dar: die chemische und biologische Inertheit gegenüber dem umgebenden Milieu. Abstoßungsprozesse, chemische Reaktionen und mechanische Beanspruchung erfordern die Verwendung von Materialien, welche individuell für ihren klinischen Verwendungszweck entwickelt und angepasst wurden. Die dazu gewonnenen Erkenntnisse in den Werkstoffwissenschaften sowie der Mikro- und Nanotechnologie ermöglichen die Modifizierung von Materialien im atomaren Bereich. Die Dotierung von Fremdatomen im Festkörper und die Strukturzeugung bzw. Strukturveränderungen von Festkörperoberflächen verändern die chemischen und mechanischen Eigenschaften des Materials. Biologische Prozesse und Chemische Reaktionen lassen sich auf diese Weise indirekt steuern und kontrollieren, weil die verwendeten Materialien unterstützend bzw. reaktionshemmend in die Prozessschritte einwirken. Mit modernen Laser-Bearbeitungsanlagen lassen sich Materialien mikrotechnisch in Abhängigkeit von der Wellenlänge bearbeiten [1]. Die Strukturierung bzw. Strukturzeugung im atomaren Bereich ermöglicht die Formung und Anpassung der Festkörperoberfläche an die

vorherrschende Gewebemorphologie. Prozesse wie Zellwachstum und Zelladhäsion können positiv beeinflusst werden und die Wahrscheinlichkeit einer Abstoßungsreaktion wird minimiert. In den Fokus neuer Untersuchungen sind die den diamantartigen Kohlenstoffschichten (engl. DLC- diamond like carbons) Schichten zugeordneten wasserstofffreien, amorphen Kohlenstoffschichten (ta-C) gerückt. Sie gelten als ideale Ergänzungen zu den bisherigen, in der Biomedizin verwendeten Materialien wie Titanlegierungen oder rostfreie Stähle.

Im Rahmen der vorliegenden Masterarbeit wird die Proliferation der Zelllinie SAOS-2 auf ta-C beschichteten Substraten unter Verwendung des Cell Viability Assays Cell Titer Blue und der digitalen Bildverarbeitungssoftware CellProfiler hinsichtlich fördernder oder hemmender Einflussfaktoren auf das Wachstums- und Adhäsionsverhalten untersucht.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Zelluläre Prozesse

Die Zelle ist der Grundbaustein aller Lebewesen und stellt die kleinste, selbständig funktionierende Einheit eines Organismus dar. Der Durchmesser einer Zelle ist stark von der Funktion abhängig, die sie im Zellverband übernimmt und variiert zwischen 60 µm und 100 µm. Zellen bestehen aus 70% – 85% Wasser. Zu den Grundbausteinen gehören Proteine, Lipide und Kohlenhydrate [2].

Zu den grundlegenden Merkmalen einer Zelle gehören:

- Wachstum, Entwicklung und Zellteilung
- Metabolisierung von Nährstoffen zur Energiegewinnung
- Reaktion auf Reize
- Möglichkeit der Bewegung
- Strukturiertheit

Die Eukaryoten-Zellen sind kompliziert strukturiert und organisiert. Sie besitzen einen Zellkern mit Kernhülle, in dem die Erbinformation auf den Chromosomen, kodiert in Form der DNA, vorliegt. Diese Zellen existieren überwiegend in Zweckverbänden und übernehmen dort unterschiedlichste Funktionen. Diese Form der Organisation führt zu einer hohen Spezialisierung, die die Überlebensfähigkeit der einzelnen Zelle stark verringert. Zur eukaryotischen Zellgruppe gehören die Pilze sowie die tierischen und pflanzlichen Zellen [3].

2.1.1 Proliferation (Zellzyklus / Zellteilung)

Als Zellzyklus bezeichnet man die Fortpflanzung eukaryotischer Zellen. Nach erfolgreichem Abschluss entstehen aus einer Mutterzelle zwei identische Tochterzellen. Jede dieser Tochterzellen verfügt über einen identischen und vollständigen Chromosomensatz und gleicht genetisch der Ausgangszelle.

Der Zellzyklus wird in 2 Phasen unterteilt: die M-Phase und die Interphase. Die M-Phase unterteilt sich wiederum in die Mitose und die Cytokinese [3].

- Im Prozess der Zellteilung wird in der Mitosephase, das Chromosomenmaterial des Genoms erbgleich auf die Tochterzellen verteilt. Die Mitose ist durch mehrere Phasen charakterisiert.
- Die Cytokinese stellt den Zellteilungsprozess, in dem die Spaltung der ganzen Zelle in zwei Tochterzellen erfolgt, dar. Die identischen Erbinformationen ermöglichen den Tochterzellen, die Funktionen und Aufgaben der Mutterzelle zu übernehmen.
- Als Interphase definiert man den Zeitraum der zwischen zwei Kernteilungsprozessen liegt. Die Interphase unterteilt sich in mehrere Abschnitte, in denen die Zelle eine intensive Wachstumsphase erfährt und das replizieren der DNS erfolgt [1].

2.1.2 Regulation des Zellzyklus

Die Regulation des Zellzyklus erfolgt durch externe und interne Kontrollmechanismen. So wird die Zellteilung extern durch physiologische Parameter, wie zum Beispiel die Kontaktinhibition, eingeschränkt. Dies geschieht, sobald sich die Membranen benachbarter Zellen berühren und führt zur Unterbrechung des Zyklus. Ein weiterer externer und indirekter Kontrollmechanismus ist das Nährstoffangebot. Steigt die Anzahl der Nachbarzellen, so konkurrieren diese Zellen um das vorhandene Nährstoffangebot und entziehen sich gegenseitig Wachstumsfaktoren, indem sie mit ihren Rezeptoren aneinander binden.

Die Kontrollmechanismen einer Zelle unterliegen der routinemäßigen Überprüfung durch zellinterne Prozesse und werden nicht durch externe Faktoren ausgelöst oder beeinflusst. Die Zellteilung wird erst dann initiiert, wenn sich die Zelle in der Interphase ausreichend entwickeln konnte und eine bestimmte Größe erreicht hat, um lebensfähige Tochterzellen hervorzubringen. Der Zellzyklusarrest (Unterbrechung der Zellzyklusphase) wird ebenfalls ausgelöst, sobald defekte DNA- Sequenzen bzw. fehlerhafte oder unvollständige DNA-Replikationen registriert werden. Die Zelle verweilt in ihrer aktuellen Zyklusphase und aktiviert Reparatur- Gene. Gelingt es der Zelle nicht, die Fehler zu korrigieren, so wird der kontrollierte Zelltod, die Apoptose, eingeleitet [3]. Die Apoptose wird als programmierter Zelltod beschrieben und ist ein genetisch gesteuerter Prozess, der sich durch biochemische und morphologische

Eigenschaften von der Nekrose unterscheidet. Durch diesen Prozess können sämtliche Proteine, Lipide und Nukleotide „recycelt“ und dem Kreislauf zurückgeführt werden. Im gesunden Organismus wird die Apoptose nur von entarteten und beschädigten Zellen betrieben, deren zelleigene Reparaturprozesse die krankhaften Veränderungen nicht kompensieren können. Dieser Prozess ist überlebenswichtig für mehrzellige und höher organisierte Lebewesen. Die Regeneration von Gewebe, Abbau von ausgedienten Immunzellen, Kontrolle der Anzahl von Zellen und der Gewebsgröße etc. werden auf diese Weise im Organismus reguliert [4].

2.2 Struktur und Aufbau natürlicher Gewebe

Jedes Gewebe stellt einen komplexen Verbund unterschiedlicher Zelltypen dar. Die Funktion des Gewebes wird durch den strukturellen Aufbau des Zellverbundes bestimmt. Eine vollständige Beschreibung des Zellverbundes wird durch die drei folgenden Komponenten ermöglicht.

1. Die Zelle, als kleinste funktionale Einheit mit einem für sie typischen Metabolismus
 2. Extrazelluläre Matrix (ECM), bildet eine Art Vermittler zwischen den Zellen und der Oberfläche
 3. ECM als Trägerstruktur, welche dem Zellverbund die spezifische Form und Stabilität verleiht
- [1]

2.2.1 extrazelluläre Matrix und Zelladhäsion

Für den Prozess der Proliferation benötigen Zellen im Verbund eine Oberfläche, an der sie anhaften, wachsen und sich vermehren können. Diese Oberfläche wird durch die extrazelluläre Matrix gebildet. Die extrazelluläre Matrix (ECM) umgibt viele tierische Zellen und besteht aus einem Netzwerk struktureller Makromoleküle (z.B. matrixgebundene, immobilisierte Proteine) [1]. Diese befinden sich im Interzellularraum, darunter wird der Bereich zusammengefasst der zwischen zwei Zellen liegt [5]. Die ECM entsteht durch den Prozess der Sezernierung, d.h. die Zellen im Verbund sondern eine Art Sekret ab, welches anderen Zellen und ihren Rezeptoren ermöglicht

an die Matrixproteine zu binden und so einen Verbund herzustellen. Die direkten Berührungsstellen von Zellen in einem Gewebeverbund und an Substratoberflächen werden Zellkontakte (engl. cell junctions) genannt. Diese werden von allen mehrzelligen Lebewesen gebildet. Der Kontakt zwischen den Zellen untereinander bzw. Zellen und der extrazellulären Matrix wird durch Adhäsion realisiert. Transmembranproteine wirken als Adhäsionsmoleküle und sind auf beiden Seiten der Zellmembran vorhanden. Durch diese Adhäsionskräfte erreicht der zelluläre Zweckverband seine Form, spezifische Elastizität sowie Zugfestigkeit und gewährleistet Kommunikations- und Interaktionsmöglichkeiten zwischen den Zellen im Verbund [1].

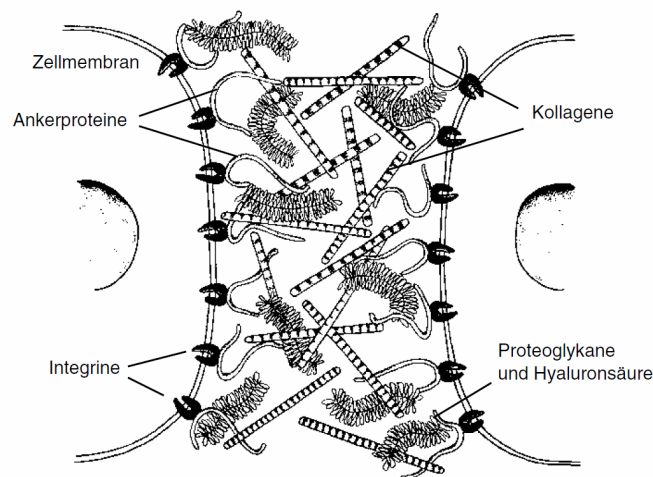


Abbildung 1: Darstellung der extrazellulären Matrix [1]

Allgemein können zwei Formen der zellulären Adhäsion unterschieden werden. Bei der Zell-Zell-Adhäsion sind Zelladhäsionsmoleküle und physikalische Bindungen zwischen benachbarten Zellen für die Entstehung von Adhäsionskräften verantwortlich. Die Interaktionen zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix wird durch biologische Erkennungssignale ausgelöst. Rezeptoren, die sich auf der Zelloberfläche befinden, binden an bestimmte Makromoleküle (matrixgebundene, immobilisierte Proteine) der ECM [3][6]. Es wurden bisher vier Hauptgruppen von Adhäsionsrezeptoren auf Zelloberflächen identifiziert. Davon sind die Cadherine, Selectine und die Proteine der Immunoglobulin Superfamilie überwiegend an der Zell-Zell-Adhäsion beteiligt [7][8]. Die vierte Klasse der Adhäsionsrezeptoren, die Integrine, sind sowohl bei der Zell-Zell-Adhäsion vertreten, übernehmen jedoch auch

eine wichtige Aufgabe bei den Adhäsionsvorgängen zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix. Zu den extrazellulären Matrixproteinen gehören die Gruppe der Kollagene, Fibronectine, Vitronectine, Von Willebrand Faktoren und Laminin [5]. Durch den Kontakt mit den Rezeptoren, die sich auf den Zelloberflächen befinden, ist die ECM kontinuierlichen Umwandlungs- und Umstrukturierungsprozessen unterworfen. Zellen können untereinander und auf Substratoberflächen adhären, sich ausbreiten, Proteine austauschen und eine neue extrazelluläre Matrix mit unterschiedlicher Proteinzusammensetzung sezernieren [1]. Die sezernierten Proteine der ECM beeinflussen die äußere Form, innere Architektur des Gewebes, die mechanische Stabilität und fördern im großen Umfang die Adhäsion von Zellen auf Substratoberflächen [9].

2.2.2 Wechselwirkungen mit dem Trägersubstrat

In vitro ist die zelluläre Adhäsion von verschiedenen Einflussfaktoren abhängig. So muss für die Kultivierung von Zellen die Oberflächenchemie und -physik mit berücksichtigt werden. Die Adsorption von Proteinen auf Implantatmaterialien erfolgt um ein Vielfaches schneller als die Adhäsion von Zellen, somit kontrollieren die adsorbierten Proteine den Typ von Zellen, der an der Oberfläche adhärert und wie stark diese Verbindung ausgebildet wird. Proteine, die einen wesentlichen Anteil zum Adhäsionsmechanismus von Zellen beitragen, bestehen aus Aminosäuren. Aminosäuren besitzen unterschiedliche hydrophile bzw. hydrophobe Eigenschaften. Die Charakterisierung einer Oberfläche hinsichtlich hydrophiler oder hydrophober Eigenschaften wird durch die Benetzung, darunter versteht man den adhäsiven Kontakt zwischen Festkörper und Flüssigkeit, ermöglicht. Die Benetzung wird durch Verwendung eines sogenannten Kontaktwinkels beschrieben. Der Kontaktwinkel kann Winkel zwischen 0° (vollständige Benetzung) und 180° (vollständige Nichtbenetzung) einnehmen. Hydrophobe Oberflächen werden durch Kontaktwinkel größer als 90° zwischen Wasser und Oberfläche charakterisiert. Hydrophile Oberflächen zeichnen sich hingegen durch Kontaktwinkel kleiner als 90° aus. Hydrophile Oberflächen bilden eine bis zu $100\ \mu\text{m}$ dicke Schicht aus Wassermolekülen. Diese begünstigen die Adsorption verschiedener Arten von Proteinen. Daher ist die Benetzbarkeit einer Oberfläche ein entscheidender

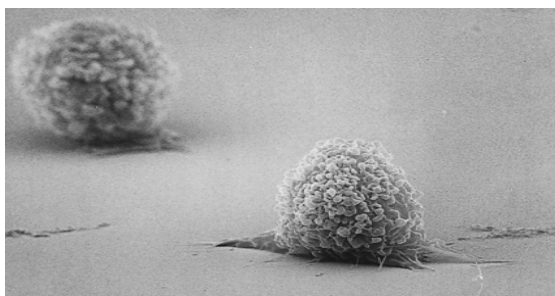
Einflussfaktor für das Adhäsionsverhalten einer Zellkultur [9]. Untersuchungen mit hydrophilen und neutralen Oberflächen ergaben eine verbesserte Zelladhäsion im Vergleich zu hydrophoben Oberflächen [10][11]. Dieses wird auch durch die elektrischen Eigenschaften der Werkstoffoberfläche beeinflusst. Die Zellmembranen besitzen ein negatives Potenzial und metallische Werkstoffe können, aufgrund ihrer hohen elektrischen Leitfähigkeit, Redoxreaktionen hervorrufen. Die entstehenden Reaktionsprodukte wiederum beeinflussen direkt den Stoffwechsel einer Zelle und können Adhäsionsproteine denaturieren [1]. Die Topographie des Trägersubstrates beeinflusst ebenfalls die Proteinadsorption an der Werkstoffoberfläche. Daher sind in den Fokus neuer Untersuchungen solche Materialien gerückt, deren Oberflächen mit Nanotechnologie modifiziert werden können. Die reaktivste Region eines Substrates ist die Oberfläche. Durch das Aufbringen von Nanopartikeln lässt sich die Anzahl der Fehlstellen an der Oberfläche vergrößern. Dies wiederum erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass sich an diesen Orten Proteine wie zum Beispiel Enzyme anlagern und so die katalytische Wirkung der Oberfläche erhöhen [12]. Zwei Proteine, das Fibronectin und Vitronectin, adsorbieren bevorzugt auf nanostrukturierten Oberflächen. Ihre Aminosäuresequenzen wiederum fördern in großem Umfang die Zelladhäsion [9].

2.2.3 Zell-Adhäsion und Wachstum auf Trägersubstraten

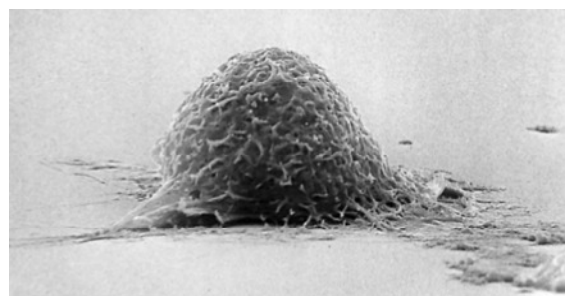
Die chemischen und physikalischen Eigenschaften sowie der topographische Verlauf der Werkstoffoberfläche beeinflussen das Adhäsions- und Wachstumsverhalten von Zellen [1]. Die spezifische Organisation des Zellverbundes und die daraus resultierende Interaktion zwischen Zellen im Verbund, sowie Zellen und der ECM, muss durch Trägermaterialien ermöglicht werden. Zellen verfügen über eine Vielzahl unterschiedlicher Adhäsionsmechanismen, welche durch Proteinadsorption auf der Substratoberfläche beeinflusst werden. Diesen Adhäsionsmechanismen werden die Extrazellulären Matrix Kontakte, die geschlossenen Kontakte sowie die Fokalkontakte zugeordnet. Die Adhäsion in einem großflächigen Gebiet mit Entfernungen größer als 100 nm zwischen Zelle und dem Substrat wird durch Extrazelluläre Matrix Kontakte realisiert. Geschlossene Kontakte bilden sich überwiegend im Bereich der Fokalkontakte aus und umgeben diese im Abstand von 30 bis 50 nm. Die stärkste

Verbindung zwischen Zelle und Oberfläche wird durch Fokalkontakte in einem Abstand von 10 bis 20 nm realisiert und stellt den eigentlichen Verankerungskontakt (engl.= adhering junctions), zwischen der Zelle bzw. der ECM und der Substratoberfläche her [9]. Im Gegensatz zu hydrophoben Oberflächen konnte die Qualität der Fokalen Adhäsion durch die Verwendung von neutralen und geladenen Oberflächen verbessert werden [11].

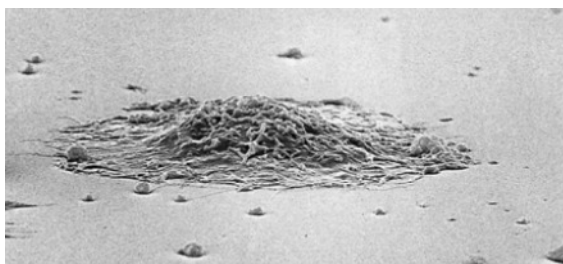
In wässrigem Medium suspendierte tierische Zellen besitzen eine runde bis ovale Form, dies ist auch in Abbildung 2a. dargestellt. Tritt die Zelle mit einer Werkstoffoberfläche in Berührung, bildet die Zelle Ausläufer aus (siehe Abbildung 2b). Diese gehen eine stabile Verbindung mit der Oberfläche ein. Die Unterseite der Zelle ist nicht vollständig an die Substratoberfläche angepresst. Die Zelle bildet vereinzelte, unregelmäßig verteilte Fokalkontakte zur Oberfläche aus. Diese binden das Aktin-Zytoskelett einer Zelle mechanisch an ein Substrat und fungieren auch als Signalüberträger. Durch diese Fokalkontakte ist es der Zelle möglich, mechanische Kräfte aufzubauen bzw. auf äußere Kräfte zu reagieren. Fokalkontakte besitzen in ihrer Plasmamembran vermehrt Integrine. Sie bilden keine permanenten Strukturen, sondern können je nach Stimulierung durch die Zelle wieder aufgelöst werden. Dies erfolgt, sobald die Zelle sich bewegt bzw. in die Phase der Mitose übergeht. Fokalkontakte bilden sich überwiegend in vitro aus [3]. In der Abbildung 2 sind die einzelnen Adhäsionsschritte am Beispiel von Maus-Fibroblasten dargestellt.



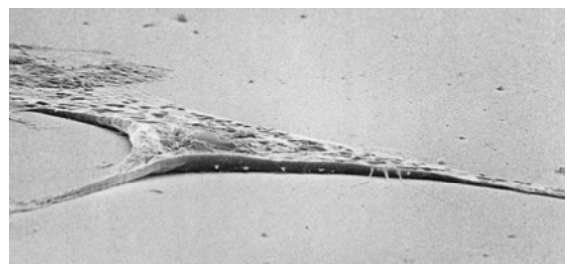
a.) 30 Minuten



b.) 60 Minuten



c.) 2 Stunden



d.) 24 Stunden

Abbildung 2: Schritte bei der Ausbreitung von Maus-Fibroblasten auf einem Deckglas am Beispiel von REM-Bildern [3]

2.3 Zellkulturen

Eine einfache Beurteilung von biologischen Reaktionen auf einen Fremdstoff wird durch Zelllinien ermöglicht. Die Durchführung von qualitativen und quantitativen Tests ermöglicht es, Änderungen in der Zellstruktur und Zellfunktion zu registrieren und die notwendigen Schlussfolgerungen daraus abzuleiten.

Je nach Untersuchungsgebiet gibt es unterschiedliche Kultivierungsmethoden. Hämatopoetische Zellen werden als Suspensionszellen kultiviert. Suspensionskulturen werden dadurch charakterisiert, dass die hier vorliegenden Zellkulturen den Prozess der Proliferation (Zellteilung/ Zellzyklus) im Nährmedium durchführen können. Die Adhäsion an einer Substratoberfläche wird dazu nicht benötigt [13]. Adhäsionskulturen jedoch zeichnen sich dadurch aus, dass die Zellen eine Oberfläche benötigen, an der sie anwachsen und sich vermehren können. Sie benötigen die Adhäsion an der Substratoberfläche, damit die Zellviabilität erhalten bleibt. Ist der Adhäsionsvorgang beendet, vermehren sich die Zellen bis der Boden der Zellkulturflasche vollständig bedeckt (konfluent) ist [1].

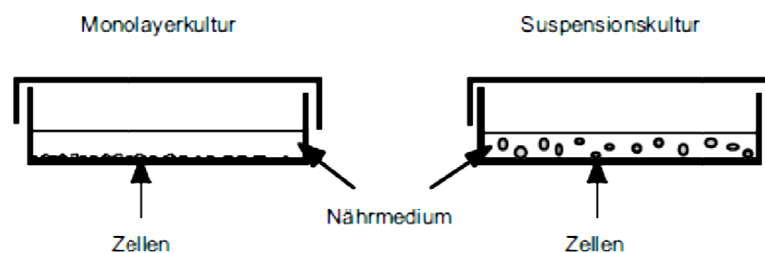


Abbildung 3: Kultivierungsmethoden [1]

2.4 Dünnschichttechnologie

Reaktionen, die ein nichtorganisches Implantatmaterial im biologischen Organismus hervorruft, werden von der chemischen Zusammensetzung und der Struktur der Implantatoberfläche bestimmt [14]. Dünne Beschichtungen stellen eine gute Methode dar, die Verträglichkeit an den Grenzflächen zwischen organischem Gewebe und nichtorganischen Materialien zu verbessern und die mechanischen Eigenschaften und die Funktionalität des Implantats unverändert nutzen zu können. Anwendungen dünner Beschichtungen auf Biomaterialoberflächen sind unter anderem:

- (1) Beeinflussung der Proteinadsorption
- (2) Beeinflussung des Zellwachstums und der Zelladhäsion
- (3) Optimierung der Korrosions- und Verschleißbeständigkeit.

Die Dünnschichttechnologien nutzen die Mechanismen der vakuum-, plasma-, und ionenbasierten Verfahren zur Schichtabscheidung. Den Vakuumtechniken werden die Verfahren der Chemische Gasphasenabscheidung (engl. CVD- Chemical vapour deposition) und der Physikalischen Gasphasenabscheidung (engl. PVD- Physical vapour deposition) zugeordnet [1]. Die PVD-Technologie stellt ein Beschichtungsverfahren zur Abscheidung von Metallen, Legierungen oder chemischen Verbindungen dar, welches auf der Zufuhr von thermischer Energie und Teilchenbeschuss im Hochvakuum basiert. Ein vollständig materiefreier Raum ist technisch nicht zu realisieren, daher werden die Vakua je nach verbleibender Restmaterie in verschiedene Kategorien eingeteilt. Das Hochvakuum ist durch einen Druck von 10^{-3} - 10^{-7} mbar und einer Restteilchenmenge von 10^9 - 10^4 Molekülen pro cm^3 charakterisiert [15].

2.4.1 Amorpher Kohlenstoff

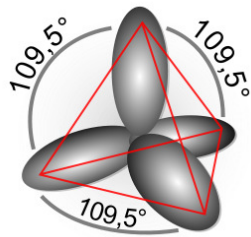
Die amorphen Kohlenstoffschichten werden den diamantartigen Kohlenstoffschichten (DLC-Schichten) zugeordnet. Diese können in drei Gruppen eingeteilt werden. In metallhaltige Verbindungen: a-C:Me, in wasserstoffhaltige Verbindungen zu denen a-C:H und ta-C:H gehören und in wasserstofffreie Verbindungen, denen die a-C und ta-C Verbindungen zugeordnet werden.

Die Elektronenkonfiguration von atomarem Kohlenstoff ist $[1s^2 2s^2 2p^2]$ und gibt die Besetzung der einzelnen s und p Orbitale mit Elektronen an. Das Bindungsverhältnis zwischen den Nachbaratomen wird durch die Hybridorbitale bestimmt. Amorpher Kohlenstoff besteht aus sp^2 - und sp^3 - hybridisierten Kohlenstoffatomen, die in vernetzter und regelloser Nahordnung vorliegen. Das Verhältnis der Bindungsanteile an sp^2 - und sp^3 - hybridisierten Kohlenstoffatomen bestimmt die Eigenschaften des Gefüges.

Die sp^3 Hybridisierung ist durch vier energetisch gleichwertige sp^3 -Orbitale charakterisiert und wird aus drei 2p-Orbitalen und einem 2s-Orbital gebildet. Jedes Orbital ist mit einem Valenzelektron besetzt. Es sind 4 Atome um jedes Kohlenstoffatom angeordnet. Dies ist in Abbildung 4a auf der folgenden Seite dargestellt. Im Gegensatz dazu werden bei der sp^2 -Hybridisierung aus den zwei 2p-

Orbitalen und dem 2s-Orbital drei sp^2 -Orbitale mit drei Valenzelektronen ausgebildet, 3 Atome lagern sich um das Kohlenstoffatom an (siehe Abbildung 4b)[16].

a.)



b.)

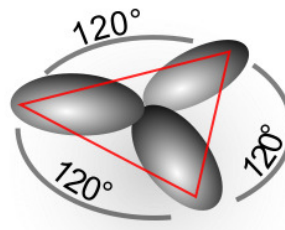


Abbildung 4a,b: Atommodell von Graphit- und Diamantstruktur. **a.)** Vier sp^3 -Orbitale richten sich tetraedisch in gleichen Winkeln zueinander aus. **b.)** Drei sp^2 -Orbitale richten sich in einer Ebene symmetrisch (hexagonal) zueinander aus. [17]

Die Eigenschaft der Elektronen, auf den besetzten Orbitalen Hybridzustände einzunehmen, bringt verschiedene Modifikationen des Kohlenstoffs hervor, unter denen zwei kristalline Formen, das Graphit und der Diamant, bekannt sind. Das Graphit besteht aus sp^2 -hybridisierten Kohlenstoffatomen und stellt die „weichere“ Modifikation dar. Ein Kohlenstoffatom ist über kovalente Bindungen mit drei weiteren Atomen verknüpft und bildet eine hexagonale Struktur aus, die in einer Ebene liegt. Dies ist in Abbildung 5 schematisch dargestellt. Diese übereinander angeordneten Kohlenstoffschichten sind durch die Van-der-Waals Kräfte gebunden. Die Van-der-Waals Kräfte gehören zu den relativ schwachen elektrostatischen Kräften und werden aufgrund von ungleichmäßigen Ladungsträgerverteilungen in der Atomhülle hervorgerufen. In diesem Zusammenhang wird von einem Dipol gesprochen, dieser ist durch die räumliche Trennung des positiven Ladungsschwerpunktes vom Schwerpunkt der negativen Ladung charakterisiert. Wechselwirken zwei Moleküle elektrostatisch miteinander, so kann es durch die Influenz zu einer Ladungsträgerverschiebung aufgrund des elektrischen Feldes kommen: die Dipole richten sich aneinander aus und verursachen Anziehungskräfte zwischen den Molekülen [15].

Die zweite kristalline Form des Kohlenstoffs ist der Diamant, dessen Kohlenstoffatome sp^3 -hybridisiert sind. Jedes Kohlenstoffatom ist über kovalente Bindungen mit vier weiteren Atomen verknüpft und bildet eine tetraedrische Struktur aus. Dies ist in Abbildung 6 schematisch dargestellt. Die tetraedrische Struktur bildet das Grundgerüst des Diamantgitters und wird durch die Überlappung von sp^3 -

Orbitalen der Atome hervorgerufen. Beim Diamant werden die Ebenen nicht wie beim Graphit durch van der Waals-Kräfte, sondern durch Elektronenpaarbindungen zusammengehalten [18].

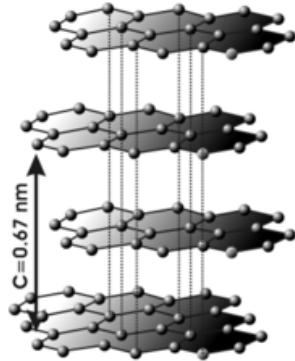


Abbildung 5: hexagonale Struktur von Graphit, Dichte=2,26 g/cm³[19]

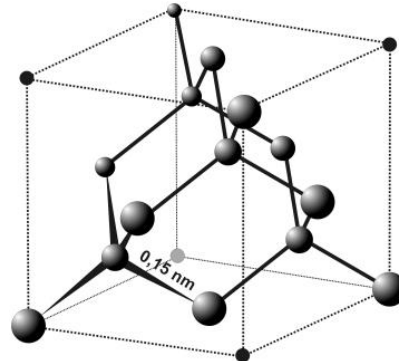


Abbildung 6: tetraedrische Anordnung der Kohlenstoffatome im Diamantgitter, Dichte 3,51 g/cm³ [17]

Der Anteil an sp^2 bzw. sp^3 gebundenem Kohlenstoff hat entscheidenden Einfluss auf die meisten Schichteigenschaften des Materials wie zum Beispiel die Härte und chemische Inertheit. Die Härte der Kohlenstoffschichten steigt proportional zum Anteil an sp^3 -Bindungen an und ist vom Wasserstoffgehalt im Material abhängig, dieser darf 10 % nicht überschreiten. Dies trifft für den tetraedrisch wasserstofffreien amorph gebundenen Kohlenstoff (ta-C Schichten), eine spezielle Form der DLC Schichten, zu. Die ta-C Schichten zählen aufgrund ihrer Bindungseigenschaften zur Gruppe der Superhartmetalle, besitzen nach den kristallinen Diamantschichten die zweithöchste Härte, sind thermisch stabil bis ca. 600°C und sind durch einen sp^3 -Anteil zwischen 60 bis 90 % charakterisiert [18], [20],[21]. Ein weiterer Vorteil dieser Verbindungen besteht darin, dass sie aufgrund ihrer amorphen Struktur auf Substraten mit einer geringen Oberflächenrauigkeit abgeschieden werden können.

2.4.2 Herstellung von ta-C Schichten

Die ta-C Schichten werden mittels Laserpulsablation (enlg. PLD- Pulsed laser deposition) aus reinen Graphittargets hergestellt. Das PLD- Verfahren wird der physikalischen Gasphasenabscheidung (PVD-Verfahren) zugeordnet und ist, in Abbildung 7 auf der folgenden Seite schematisch dargestellt. Die Substrattemperatur beträgt ca. 95°C, da höhere Substrattemperaturen zu einer Reduzierung des sp^3 -Bindungsanteils führen. Die Absorption der Energie der Laserstrahlung führt zur

Verdampfung des Targetmaterials und bei ausreichendem Energieeintrag zur Bildung eines Plasmas. Als Plasma wird ein angeregtes Gasgemisch mit einem erhöhten Anteil an Ladungsträgern bezeichnet. Plasmen sind quasineutral, sie besitzen gleich viele positive und negative Ladungsträger [15]. Ein Plasma setzt sich aus Neutralteilchen, Ionen, Elektronen, freien Radikalen und metastabilen Molekülen zusammen [22]. Plasmen werden durch inhomogene Verteilungen von positiven und negativen Ladungsträgern charakterisiert. Die damit entstehenden und oft wechselnden Gebiete mit Ladungsträgermangel und -überschüssen erzeugen lokale, elektrische Felder die wiederum auf die Ladungsträger innerhalb des Plasmas wirken [23]. Die Herstellung der dünnen Schichten mit dem PLD Verfahren ermöglicht Beschichtungsraten von 10-100 $\mu\text{m/s}$ und die Kombination mehrerer Materialien zu sogenannten Mehrschichtsystemen und Gradientenschichten [24].

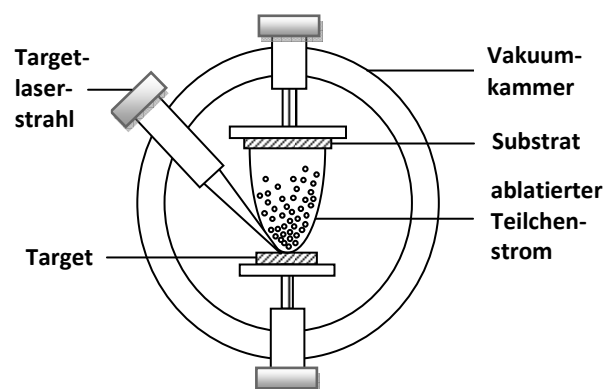


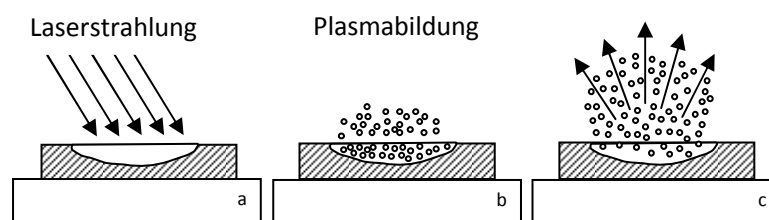
Abbildung 7: schematische Darstellung PLD Verfahren

Die Laserpulsablation PLD setzt sich wiederum aus 3 Teilschritten zusammen und ist schematisch in Abbildung 8 dargestellt.

1. Strahlführungs- und Strahlformungseinrichtungen fokussieren den Laserstrahl auf das Target. Die Absorption der Strahlung erfolgt in einem kleinen oberflächennahen Volumenbereich, in dem sich sehr hohe Energieflussdichten ausbilden. Die Wellenlänge sowie Materialart des Targets limitieren die Absorptionstiefe der Strahlung. Durch Energieabgabe der auftreffenden Photonen an die freien Elektronen des Targets, erfolgt innerhalb des bestrahlten Bereiches die Anregung von Molekül- und Gitterschwingungen. Der Materialabtrag vom Target erfolgt, sobald die Fluenz der Laserstrahlung die Schwellfluenz des Targets überschreitet.

2. Das Target wird innerhalb von weniger als 10 ns erwärmt. Durch Wärmeleitung wird nur ein sehr geringer Energieanteil in das umliegende Targetmaterial abgeleitet. Geringe Pulszeiten und ein hoher Energieeintrag in ein verhältnismäßig kleines Volumen bewirken eine Erwärmung über die Schmelz- und Verdampfungstemperatur hinaus. Die bestehenden Atombindungen im Target werden aufgebrochen und das Material wird aufgeschmolzen. Es bildet sich ein hochdichtes Plasma mit hohen kinetischen Energien der Teilchen heraus, welches durch den hohen Druck explosionsartig expandiert. Mit sehr hohen kinetischen Energien verlassen die Teilchen und Teilchenverbände, sogenannte Droplets, die Targetoberfläche und bilden einen Teilchenstrom. Die ablatierten Teilchen entfernen sich vorzugsweise senkrecht gerichtet von der Targetoberfläche. Wird ein Substrat in einem vorgegebenen Abstand gegenüber dem Target angeordnet, so wachsen die ablatierten Teilchen dort als Schicht auf [24].
3. In dem sich ausbildenden Teilchenstrom, wird ein Teil der Laserstrahlung absorbiert wodurch es zu Ionisation und Plasmaausbildung kommt. Dabei sinkt die Energiedichte der Laserstrahlung auf der bestrahlten Oberfläche [24]. Infolge von Absorption des Restlaserpulses wird das gebildete Plasma weiter erhitzt und expandiert. Weitere Ionen, Elektronen, Atome und Droplets werden ausgestoßen.

Die Eigenschaften des Plasmas, d.h. die räumliche Verteilung, Anzahl, Ionisierungsgrad sowie die kinetische Energie der ablatierten Teilchen werden durch die Laserstrahlparameter wie Fokusgröße, Strahlqualität und Energieflussdichte, Energieverteilung sowie Pulsfrequenz bestimmt [23].



Ablationsprozess:

- a. absorption des Laserstrahls in kleinem Volumen
- b. hoch dichtes Plasma
- c. ablatierte Teilchen entfernen sich von der Targetoberfläche

Abbildung 8: Ablationsprozess schematisch

2.5 Biokompatibilität von DLC- und ta-C - Schichten

Im Mittelpunkt jeder Untersuchung steht die Verträglichkeit zwischen dem biologischen und dem technischen System. Die Grundfunktionen eines Organismus dürfen durch die Applikation der Werkstoffe nicht beeinträchtigt werden. Da an den Grenzflächen zwischen Material und Gewebe unterschiedliche Reaktionen erfolgen können, muss die chemische und biologische Inertheit des verwendeten Materials gegenüber dem umgebenden Medium gewährleistet werden.

Die Wechselwirkungen zwischen Implantat und Gewebe umfassen folgende Reaktionen:

- Erstreaktion an der Materialoberfläche
- Lokale Gewebereaktion
- Korrosion oder Abbau des Implantatmaterials
- Systemischer Effekt

Die sogenannten Implantat- Gewebe Interaktionen können in toxische, inerte und bioaktive Implantateigenschaften unterteilt werden [1]. Die besonderen Eigenschaften von ta-C, wie diamantähnliche Härte, hohe Abriebfestigkeit sowie Korrosionsbeständigkeit, befürworten die Verwendung dieser Beschichtungen auf Implantaten im menschlichen Organismus. Beschichtungen von Implantaten verringern den, durch Koagulationsbewegung zweier Materialien unterschiedlicher Härte, verursachten Abrieb. Eine weitere Anforderung an die Beschichtung, insbesondere in dem sauren Milieu von Körperflüssigkeiten, ist die Haftfestigkeit auf der Substratoberfläche. Ta-C Schichten mit ihren guten tribologischen Eigenschaften (Reibung) stellen eine gute Alternative zu den bisher üblichen Materialien dar [25]. Implantatmaterialien wie rostfreie Stähle, Titan-Oxide und CoCrMo-Verbindungen können korrodieren oder Metallionen in den Organismus abgeben und so die Standzeiten von Implantaten erheblich reduzieren [26]. Die heraus gelösten Ionen werden verdächtigt, allergische Reaktionen auszulösen und das Tumorstadium zu begünstigen [27]. Eine weitere Anforderung an biokompatible Werkstoffe ist die Blutverträglichkeit. Die Hämostase (Blutgerinnung) stellt einen überlebenswichtigen Prozess dar, der die Blutung bei einer Verletzung der Gefäße

zum Stillstand bringt. Die Gerinnungskaskade kann durch die Verletzung von Gewebe (extravaskulärer Reaktionsweg) und durch Prozesse, die auf der Innenseite der Blutgefäße erfolgen (intra-vaskulärer Reaktionsweg), ausgelöst werden. Die Verschließung der Wunde erfolgt durch die Adhäsion von Thrombozyten und die Aktivierung von im Blut und Blutgefäßen vorhandenen Gerinnungsfaktoren, die in der Vernetzung der Aminosäure-Seitenketten des Fibrins und der Ausbildung eines stabilen Thrombus resultieren [2]. Über den intravaskulären Reaktionsweg kann durch die Implantation von Stents und Kathetern in Blutgefäße ungewollt die Aktivierung des Koagulationsmechanismus ausgelöst werden. Dies führt zur Bildung eines Thrombus, der den Blutfluss im Gefäß behindert und die frühzeitige Verschließung des Blutgefäßes verursachen kann. Ein nicht-thrombogenes Verhalten der Implantatoberfläche ist zwingend erforderlich. Nicht-thrombogene Werkstoffe unterbinden die Adhäsion von Thrombozyten, die Adsorption von Plasmaproteinen und verhindern die Wechselwirkung von Blutbestandteilen mit den Kontaktflächen des Implantates, die zur Auslösung der Gerinnungsvorganges führen können [1]. Die Adsorption von Plasmaproteinen, die wiederum die Adhäsion von Thrombozyten unterstützen und eine Blutgerinnung an Implantaten in Blutgefäßen hervorrufen können, konnte durch DLC bzw. ta-C Beschichtungen unterbunden werden. Dies wird auf die elektrischen Eigenschaften der Werkstoffoberfläche und den daraus resultierenden Ladungsübertragungen zwischen Proteinen und Implantat zurückgeführt [28],[29]. Die Adhäsion von Thrombozyten auf DLC und ta-C beschichteten Implantatwerkstoffen wird wesentlich durch den Anteil an sp^2 - und sp^3 - hybridisierten Kohlenstoffatomen im Gefüge beeinflusst [30]. Ta-C Schichten mit einem hohen Anteil an sp^3 - hybridisierten Kohlenstoff, einer geringen Oberflächenspannung und dem daraus resultierenden hydrophoben Charakter erschweren die Adsorption von Plasmaproteinen und unterbinden die Anlagerung von Thrombozyten und Adhäsionsproteinen [31].

2.6 Fluoreszenz

Die Spektroskopie zählt zu den wichtigsten Methoden der qualitativen und quantitativen Bestimmung von Elementen und Molekülen. Durch elektromagnetische Strahlung können einige chemische Stoffe und Substanzen zur Fluoreszenz angeregt werden. Die dafür benötigte anregende elektromagnetische Strahlung muss in einem bestimmten stoffspezifischen Wellenlängenbereich erzeugt werden, damit es zur Absorption der Strahlungsenergie durch ein freies Elektron kommen kann. Der Energieeintrag hebt das freie Elektron in das nächsthöhere Orbital und damit in einen höheren Energiezustand an. Diese höheren Energiezustände sind instabil. Nach einer geringen Lebensdauer des angeregten Zustandes (10^{-9} bis 10^{-6} s) gehen die Elektronen wieder in ihren ursprünglichen Energiezustand, den Grundzustand über. Dies erfolgt unter Abgabe von Energie in Form elektromagnetischer Strahlung. Durch Stoßprozesse und Schwingungsrelaxation und dem damit verbundenen Energieverlust enden die Übergänge unter Beachtung des Franck-Condon Prinzips in einem höheren Vibrationsniveau des elektronischen Grundzustandes. Aus diesem Grund ist das Fluoreszenzspektrum gegenüber dem Absorptionsspektrum zu kleineren Frequenzen und damit größeren Wellenlängen verschoben. Die Strahlung emittiert innerhalb eines für die jeweilige Substanz charakteristischen Wellenlängenbereiches und liegt meist im sichtbaren Bereich des Spektrums und wird als Fluoreszenz wahrgenommen [32].

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien:

EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat (Tritierkomplex III $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \times 2 H_2O$)

Carl Roth (Karlsruhe, Germany)

Ethanol (C_2H_6O)

Merck KGaA (Darmstadt, Germany)

Formaldehyd (CH_2O , 37%,p.a. ROTIPURAN)

Carl Roth (Karlsruhe, Austria)

Triton X-100

VWR (Darmstadt, Germany)

Phosphatpufferlösung PBS Dulbecco

Biochrome AG (Berlin, Germany)

Hoechst 33258 pentahydrat

Invitrogen (Karlsruhe, Germany)

BodipyFL Phalacidin

Invitrogen (Karlsruhe, Germany)

Cell Titer Blue Cell Viabilitiy Assay

Promega Corporation (Madison ,WI, USA)

3.1.2 Medien:

Fetales Bovines Serum (FBS)

Biochrome AG (Berlin, Germany)

RPMI 1640 with L-Glutamine, with Phenol Red

PAA (Pasching, Austria)

Trypsin-EDTA (1:250) (1 x)

PAA (Pasching, Austria)

Mc Coy's 5A with L-Glutamine, $NaHCO_3$

Sigma Aldrich Chemie (Steinhagen, Germany)

3.1.3 Material:

Cellstar Zellkulturflaschen, 25cm², 50ml

Greiner Bio One GmbH (Frickenhausen, Germany)

Thoma- Zählkammer

Fein Optik (Bad Blankenburg, Germany)

96-Well-Plates

Thermo Fisher Scientific (Roskilde, Denmark)

4-Well-Plates, 127,8 x 85,5mm

Nalge Nunc International (Rochester, NY, USA)

Glasobjektträger, 76 x 26 x 1 mm

Paul Marienfeld GmbH & Co. KG (Lauda-Königshofen, Germany)

3.1.4 Geräte:

Mikroskop Telaval 3

Carl Zeiss AG (Jena, Germany)

Herasafe KS 12

Thermo Scientific (Langenselbold, Germany)

Inkubator CB 150

Binder GmbH (Tutlingen, Germany)

Fluoreszenzphotometer Fluoroskan Ascent FL

Thermo Scientific (Langenselbold, Germany)

Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M

Carl Zeiss AG (Jena, Germany)

Oberflächenprofilometer DEKTAK 3030

3.1.5 Zelllinie SAOS-2

Zelllinien können bei der Firma DSMZ (= Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen) erworben werden. Weitere Bezugsquellen sind die ATCC (engl. ATCC= American Type Culture Collection), sowie die ECACC (engl.= European Collection of Cell Cultures [33]).

DSMZ- Informationsblatt

Zelllinie:	SAOS-2	
Zelltyp:	humane Osteosarkoma-Zellen	
DSMZ Nr.:	ACC 243	
Morphologie:	adhärente Zellen, wachsen als Monolayer	
Subkultur:	Aussaat bei ca. $1-2 \times 10^6$ Zellen/80 cm ²	
Verdopplungszeit:	ca. 43 Stunden	[33]

3.1.6 Glasobjektträger

Die Glasobjektträger werden von der Firma Marienfeld hergestellt und besitzen die Abmessungen von 76 x 26 x 1 mm und sind aus Natron-Kalk Glas der 3.hydrolytischen Klasse gefertigt [34]. Die Resistenz eines Glases gegenüber Wasser mit einer Temperatur von 98°C wird durch die hydrolytische Klasse beschrieben und ist ein Maß für die Extrahierbarkeit von basischen Verbindungen aus dem Glas. Die Beschichtung und Strukturierung wurde im Laserinstitut Mittelsachsen e.V. durchgeführt. Die Strukturierung erfolgte mit einem Femto- Sekunden LASER. Die Beschichtung wurde mit einem Excimer LASER (LPX300 der Firma Coherent) realisiert und die Teilstrukturen mit einer 100 nm dicken ta-C Schicht beschichtet. In Abbildung 9 sind die auf den Glasobjektträgern aufgebrauchten Strukturen und die beschichteten und unbeschichteten Bereiche der verwendeten Objektträger schematisch dargestellt.

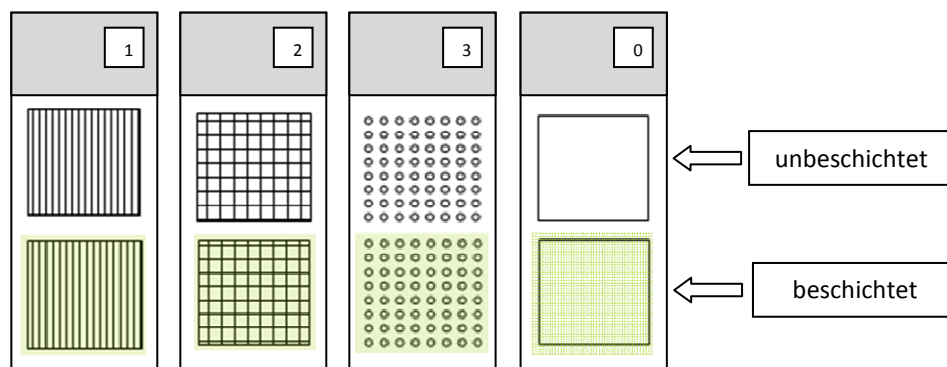


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Strukturierung der Objektträger

Die Linienstrukturen sind durch eine Periode von 200 μm und Linienbreite von 50 μm charakterisiert. Die Strukturzwischenräume reichen in eine Tiefe von ca. 15-25 μm . Die Periode der Rechteckstrukturen beträgt 200 μm , die Linienbreite variiert zwischen 45-50 μm und erreicht eine Tiefe von 15-30 μm . Die Lochdurchmesser der Punktstrukturen variieren zwischen 80-120 μm und erreichen eine Tiefe von 15-20 μm in der Oberfläche. Der Lochabstand in x-Richtung beträgt 120 μm und in y-Richtung 150 μm . Die zur Erzeugung der Strukturen verwendete Probenleistung beträgt für die Strukturen 1 und 2 $P_{\text{AV Probe}} = 116,13 \text{ mW}$. Für die Struktur 3 wurde die Probenleistung auf $P_{\text{AV Probe}} = 859,56 \text{ mW}$ erhöht. Die Laserfluenz beträgt für die Strukturen 1 und 2 $H = 9,84 \text{ J/cm}^2$ und für die Struktur 3 ist $H = 72,82 \text{ J/cm}^2$. In Tabelle 1 sind die geometrischen Abmessungen der Strukturen in μm und die verwendete Probenleistung für die Strukturen zusammengefasst.

Tabelle 1: Strukturierungsparameter der Glasobjektträger

Struktur	Abmessungen	$P_{\text{AV Probe}}$ in mW
1	Periode 200 μm Linienbreite 50 μm Tiefe 15-25 μm	116,13
2	Periode 200 μm Linienbreite 45 μm - 50 μm Tiefe 25-30 μm	116,13
3	Lochabstand _x 120 μm Lochabstand _y 150 μm Lochdurchmesser 80 μm - 120 μm Tiefe 15-20 μm	859,56

Die in die Oberfläche eingebrachten Strukturen wurden mit einem Lichtmikroskop bei 12-facher Vergrößerung fotografiert, kontrolliert und vermessen. Die Aufnahmen sind in Abbildung 10 dargestellt.

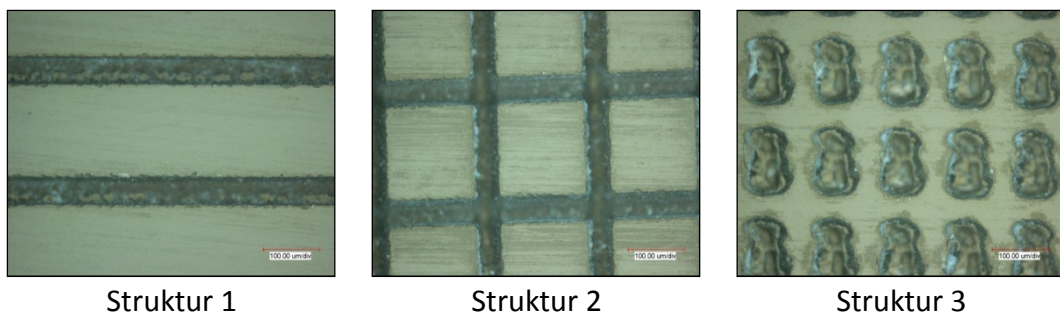


Abbildung 10: Lichtmikroskopaufnahmen der Strukturen bei 12-facher Vergrößerung

3.1.7 Thoma-Kammer

Die Thoma-Kammer ist ein Instrument zur Bestimmung der Anzahl von Zellen in einem definierten Volumen. Die Zellen werden vom Werkstoff bzw. Substrat gelöst und suspendiert. Die Zellsuspension wird in die Thoma-Kammer gegeben und eine Zellzahlbestimmung unter Verwendung eines Lichtmikroskops durchgeführt. Mit diesem Verfahren ist es möglich, die Anzahl an Zellen pro μl Lösung zu bestimmen und geeignete Verdünnungsfaktoren für Zellsuspensionen mit einer definierten oder maximal zulässigen Anzahl an Zellen pro μl bzw. ml Suspension zu berechnen.

Die Thoma-Zählkammer ist eine Glasplatte mit den Abmaßen von ca. 30 mm x 80 mm. Die Dicke der Glasplatte beträgt ca. 5 mm. Im Zentrum der Glasplatte befindet sich eine fest definierte und vertiefte Mittelfläche, auf der quadratische Felder definierter Größe eingätzt sind [1]. Das Zählgitter wird in 4 x 4 Gruppenquadrate mit jeweils 0,2 mm Kantenlänge und einer Tiefe von 0,1 mm unterteilt (siehe Abbildung 11). Die Fläche eines solchen Gruppenquadrates beträgt 0,04 mm². Jedes Gruppenquadrat wird in 4 x 4 Kleinquadrate mit je 0,05 mm Kantenlänge und 0,0025 mm² Fläche eingeteilt [35].

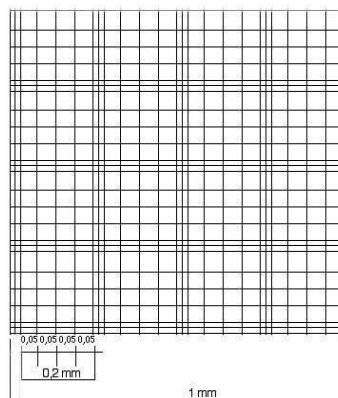


Abbildung 11: Gruppenquadrate mit den dazugehörigen Kleinquadraten [35]

Die Berechnung der Anzahl an Zellen erfolgt anhand der folgenden Formel

Zellzahlbestimmung mittels Thoma-Kammer

$$n = z * \frac{x}{\frac{1}{400} * 0,1}$$

n = Anzahl Zellen pro μl

z = Verdünnungsfaktor

x = Mittelwert der Zellen pro Großquadrat

3.1.8 Cell Titer Blue – Cell Viability Assay

Der Cell Titer Blue Assay stellt eine fluorometrische Methode zur Bestimmung der Zellviabilität dar. In der Mikrobiologie wird die Gesamtaktivität einer Zellpopulation bzw. Zellkultur unter dem Begriff der Zellviabilität zusammengefasst. Das Cell Titer Blue Assay nutzt, wie die Mehrzahl der gängigen Nachweisverfahren zur Zellaktivität, enzymatische Farbreaktionen. Zu den grundlegenden Eigenschaften von vitalen Zellen zählt die Umsetzung von Substraten. Die Metabolisierung von Stoffen kann eine charakteristische Änderung der optischen Eigenschaften eines Substrates bewirken und zeigt sich in spezifischen Reaktionen wie zum Beispiel Farbumschlag und Fluoreszenz. Das Cell Titer Blue Assay basiert auf der Verwendung des Redox-Indikator- Farbstoffs Resazurin. Diese chemische Verbindung dient als Indikator und zeigt Redoxreaktionen sowie pH-Wert Änderungen an [36]. Resazurin ist ein ungiftiger, wasserlöslicher dunkelblauer Farbstoff. Vitale Zellen können Resazurin irreversibel in das pinkfarbene Resorufin, durch den chemischen Vorgang der Reduktion, umwandeln. Resorufin ist stark fluoreszierend (579 Ex/ 584 Em). Das Cell Titer Blue Reagenz ist für den Einsatz als Endpunkt Assay entwickelt worden. Daher wird das Reagenz zur untersuchenden Zellkultur erst nach Beendigung der Kultivierung im Brutschrank dazugegeben. Die empfohlene Menge an Cell Titer Blue Reagenz beträgt 20 µl Farbstoff zu 100 µl Medium.

3.1.9 Fluoreszenzphotometer FluoroskanFL

Das Fluoreszenzphotometer FluoroskanFL der Firma Thermo Fisher Scientific besitzt eine Luminometer-Einheit und ermöglicht neben dem Messen der Lumineszenz auch das Detektieren von Fluoreszenzintensitäten. Mit Hilfe einer Dispenser- Einheit lassen sich schnelle Farbreaktionen, zum Beispiel von Enzymkinetiken, registrieren. Das Verhalten von adhärennten Zellen auf modifizierten Oberflächen kann in situ untersucht werden. Je nach Anwendung und in Abhängigkeit der verwendeten Anregungs- bzw. Emissionswellenlänge besteht die Möglichkeit, den Anregungs- und Emissionsfilter individuell an das Experiment bzw. den verwendeten Farbstoff anzupassen. Das Gerät ist so konzipiert, dass die Probenaufnahmeeinheit variiert werden kann. Die Palette der verwendeten Multiwellplatten reicht von 1 bis 384. In den Experimenten wurden 96-Well Platten zur Erstellung der Standardkurve und 4-

Well- Platten zur Untersuchung der Adhäsion und Proliferation auf Glasobjektträgern verwendet. Dadurch können sowohl kleinste Mengen als auch größere bewachsene Flächen bzw. Zellvolumina untersucht werden. Die möglichen Anregungswellenlängen des Gerätes liegen im Bereich von 320 nm bis 700 nm, die Emissionswellenlänge kann durch die geeignete Wahl von Filtern im Spektrum von 360 nm bis 670 nm variiert werden. Das Absorptionsmaximum von Resazurin liegt bei 605 nm und das von Resorufin bei 573 nm. Für die Oberflächenanalyse kann der Strahldurchmesser von 1,5 mm und 3 mm verwendet werden [37].

3.1.10 Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M der Firma Carl Zeiss

Fluoreszenzmikroskope ermöglichen die Beobachtung sogenannter Fluorochrome innerhalb einer Zelle. Diese Verbindungen absorbieren ultraviolette Strahlung und emittieren einen Teil der absorbierten Energie in Form elektromagnetischer Strahlung im sichtbaren Spektrum. Die Lichtquelle des Mikroskops emittiert ultraviolette Strahlung in einem weiten Wellenlängenbereich, diese wird durch einen im Mikroskop verbauten optischen Anregungsfilter auf das Objekt mit dem enthaltenen Fluoreszenzfarbstoff fokussiert. Den Anregungsfilter passieren nur Strahlungsanteile mit einer definierten Wellenlänge. Die so erzeugte monochromatische Strahlung entspricht der Anregungswellenlänge des verwendeten Fluoreszenzfarbstoffes. Dieser emittiert nach erfolgreicher Anregung Strahlung im sichtbaren Bereich. Je größer die Stoke'sche Differenz ist, d.h. der Abstand zwischen Anregungs- und Aussendungswellenlänge, umso schärfer erscheint das resultierende Bild. Beide Strahlenanteile, Anregungs- und Fluoreszenzstrahlung werden zum Sperrfilter geleitet, hier wird die Anregungswellenlänge eliminiert und der Strahlungsanteil des Fluoreszenzlichts wird in einem Objektiv zu einem Lichtstrahl gebündelt und kann von einem Beobachter wahrgenommen werden [3],[38].

3.1.11 Fluoreszenzfärbung

Die auf den Objektträgern adhärenen Zellen müssen für die Fluoreszenzfärbung präpariert werden. Das Fixieren ermöglicht die Struktur der Zellen zu erhalten, denn durch die Unterbrechung der Sauerstoffzufuhr sowie Nährstoffversorgung würde sonst in der Zelle die Nekrose initialisiert werden. Dies hat morphologische Veränderungen wie die Proteindenaturierung und das Anschwellen der Zellen zur Folge. Das Fixiermittel unterbindet, diese durch zelleigene Enzyme hervorgerufenen, zellulären Zerfallserscheinungen und Stoffwechselprozesse [38]. Alle Verfahren zum Fixieren von Zellen und Gewebestrukturen sind fixationslabil, d.h. der Zustand in dem sich das Gewebe während des Lebens befindet, kann nicht vollständig erhalten werden. In Abhängigkeit vom verwendeten Fixationsmittel kommt es zu morphologischen Veränderungen wie z.B. Schrumpfung und Quellung im Gewebe, wobei Gewebe mit einem hohen Wassergehalt stärker von Schrumpfungerscheinungen betroffen sind. Die Verwendung von Formaldehyd als Fixationsmittel bewirkt die Erweiterung von Spalträumen und des Interzellularraumes, hervorgerufen durch osmotische Konzentrationsunterschiede zwischen Gewebe und dem einwirkenden Fixiermittel. Die so genannte Substanzflucht ist ein weiteres Phänomen. Darunter versteht man die Verschiebung von zytoplasmatischen Einschlüssen und Zellkernen fort von dem in die Gewebestruktur hinein diffundierenden Fixiermittels. Formaldehyd bewirkt neben dem Ausfällen und Vernetzen von Proteinen auch den Entzug von Wasser. Dies führt zu einer Konzentrationserhöhung der im Zytoplasma gelösten Stoffe. Da die Stoffe in der wässrigen Phase gelöst sind und der für die freie Diffusion zur Verfügung stehende Raum durch die Vernetzung und Ausfällung sowie dem Entzug von Wasser verringert wird, weichen die gelösten Stoffe vor dem eindiffundierenden Fixationsmittel zurück. Diese Verdrängung wird durch die Zellmembranen begrenzt und die verbleibenden gelösten Stoffe werden im sich ausbildenden Proteinnetz eingelagert [38], [39].

Die Fixierung der Zellen auf den Glasobjektträgern erfolgte mit Formaldehyd. Die Fluoreszenzfärbung des Zytoskeletts erfolgte mit BodipyFL Phalloidin der Firma Invitrogen. Phalloidin wird der Gruppe der Phallotoxine zugeordnet und besitzt die Eigenschaft, Aktinfilamente zu stabilisieren. Das Protein Aktin ist unter anderem ein

Bestandteil des Zytoskeletts eukaryotischer Zellen und polymerisiert zu F-Aktin. Dieses Strukturprotein dient der Stabilisierung der äußeren Zellform und den intrazellulären Transporten. Phalloidin bindet vollständig an das F-Aktin des Zytoskeletts. Diese Eigenschaft wird in der Fluoreszenzfärbung ausgenutzt. Fluorochrome werden an Phalloidin gebunden, dieses bindet wiederum vollständig an das F-Aktin des Zytoskeletts und ermöglicht die Beobachtung von Zellen und liefert Informationen über die Verteilung von F-Aktin in der Zelle. Dieser Fluoreszenzfarbstoff emittiert Strahlung im Bereich von 512 nm [40].

Die Zellkernfärbung erfolgte mit Hoechst 33258 der Firma Invitrogen. Dieser membrandurchgängige Fluoreszenzfarbstoff wird der Gruppe der Bisbenzimidfarbstoffe zugeordnet und lagert sich spezifisch in AT-reiche Regionen der DNA an. Der Farbstoff verfügt nur über eine geringe Cytotoxizität und emittiert elektromagnetische Strahlung im blauen Bereich des Spektrums bei 450 nm [41].

3.1.12 Software CellProfiler

Die Software CellProfiler ist ein freizugängliches Open-Source Programm, entwickelt am Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge (MA). Die Software kann zur Bestimmung der Fluoreszenzintensität, Anzahl und zur Vermessung einzelner Zellen, Zellcluster oder kleiner Organismen in Verbindung mit unterschiedlichen Assays genutzt werden. Verschiedenste Typen an Zelllinien, darunter Maus-, Ratten- und humane Zelllinien wurden mit CellProfiler untersucht [42]. Mit der digitalen Bilderverarbeitung (DBV) können simultan verschiedene Messwerte und Prozessparameter analysiert werden. Die Möglichkeiten der Bildbearbeitung, wie zum Beispiel Erzeugung von Binärbildern und Zerlegung des Bildes in seine Farbspektren, ermöglichen die automatisierte Analyse und verbessern die Interpretation der Informationen, die in den digitalen Bildern gespeichert ist. Durch Bildbearbeitung wie zum Beispiel Kontrastanhebung oder Aufhellung können Informationen, die bei herkömmlicher Betrachtung nicht oder nur schwer registriert werden, im Bild sichtbar gemacht werden. Die digitale Bildanalyse ermöglicht eine quantitative Interpretation der Daten, da bereits kleinste signifikante biologische Veränderungen registriert werden [43]. Die Beleuchtungskorrektur ist eine effektive Methode, um Beleuchtungsgradienten innerhalb eines digitalen Bildes zu korrigieren

und störende Helligkeitsverläufe zu homogenisieren. Jedoch wird die Bildanalyse dadurch wesentlich beeinflusst, da so quantitative Unterschiede verdeckt und ein Signalrauschen aufgrund des DBV-Verfahrens im Bild erzeugt wird.

Die Objektidentifikation ist eine der wichtigsten Funktionen, die durch die Software realisiert wird und limitiert die Genauigkeit der Analyse und letztendlich die der resultierenden Ergebnisse. Die Zusammenfassung von aneinander liegenden Bildpunkten zu inhaltlich zusammenhängenden Regionen wird als Segmentierung bezeichnet. Eine Herausforderung in der Bildanalyse besteht somit in der Identifizierung und Differenzierung zusammenhängender Objekte und Zellcluster. Im ersten Schritt werden die zusammenhängenden Objekte identifiziert und klassifiziert. Der zweite Schritt besteht in der Erkennung der Begrenzung der zusammenhängenden Objekte. Die digitalen Bilder werden vor der Analyse in ihre roten, blauen und grünen Farbkomponenten zerlegt. Es entstehen 3 Bilder, die anteilig nur die roten, die blauen und grünen Bildpunkte darstellen. Jedem farbigen Bildpunkt wird ein Grauwert zugeordnet. In diesen Bildern können Objekte untereinander und vom Hintergrund durch die Definition einer Schwelle innerhalb der Grauwertskala, die aus der Verteilungshäufigkeit oder Histogramm der Grauwerte im jeweiligen Bild gebildet wird, differenziert werden [44]. Die gewonnenen Informationen dienen der Identifizierung von Objekten. Die primären Objekte stellen die Nuklei dar und werden als erstes identifiziert. Diese Information wird aus den Bildern gewonnen, die die Zellkernfärbung oder DNA- Färbung darstellen. Die Bildanalyse der Aktin- oder Zytoskelettfärbung ergibt die Segmentierung der sekundären Objekte. Durch Überlagerung der resultierenden Bilder ist es möglich die gesamte Zelle, die Zellmembran, den Nukleus, das Zytoplasma etc. zu visualisieren und zu vermessen. Ausgehend von diesen Informationen können die durch die Zelle und den Nukleus eingenommene Fläche, Formfaktor, die längste und die kürzeste Achse und die Anzahl an Zellen und Nuklei bestimmt werden. Die Benutzerschnittstelle der Software wurde so konstruiert, dass einem Benutzer verschiedene Analysemethoden zur Verfügung stehen und diese auf unterschiedliche Weise miteinander kombiniert werden können. Die Zusammenstellung der Analysemethoden und der Prozess nach dem die Bildanalyse erfolgt, wird als Pipeline bezeichnet und kann im Programm für eine spätere

Verwendung gespeichert werden. Unter Anlage 3 ist die Pipeline der Bildanalyse, die in diesen Untersuchungen verwendet wurde, dargestellt.

3.2 Untersuchungsmethoden

Die Untersuchungen im Rahmen dieser Masterarbeit gliedern sich in drei Abschnitte. Für jeden der drei Abschnitte wurde die Zelllinie SAOS-2 7 Tage im Brutschrank kultiviert.

Im ersten Abschnitt bestand das Ziel der Untersuchung darin, den Zusammenhang zwischen steigender Zellkonzentration und Fluoreszenzintensitäten im Zeitraum von 7 Tagen zu untersuchen und eine Standardkurve der SAOS-2 Zelllinie zu erstellen, die diesen Zusammenhang visualisiert. Somit kann in den anschließenden Versuchen jedem Fluoreszenzwert ein Zellkonzentrationswert zugeordnet werden. Die Fluoreszenzintensitäten wurden unter Verwendung des Cell Titer Blue Assay ermittelt und mit dem Fluoreszenzphotometer FluoroskanFL gemessen.

Der zweite Abschnitt untersucht die Proliferation der SAOS-2 Zelllinie, im Zeitraum von 7 Tagen, auf verschiedenen strukturierten Glasobjektträgern als Adhäsionsfläche. Die Teilstrukturen wurden mit einer 100 nm dicken ta-C Schicht beschichtet. Die Fluoreszenzmessungen und die daraus abgeleitete Zellkonzentration sollen Rückschlüsse über einen möglichen Einfluss einer ta-C Beschichtung und der verwendeten Strukturen auf die Proliferation der Zelllinie SAOS-2 geben. Die Fluoreszenz wurde mit dem Cell Titer Blue Assay und dem Fluoreszenzphotometer FluoroskanFL gemessen.

Im dritten Abschnitt werden zellspezifische Kriterien wie Fläche, Länge und Breite der SAOS-2 Zellen mit der digitalen Bildverarbeitungssoftware CellProfiler und dem Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M der Firma Carl Zeiss untersucht. Die Kultivierung der Zelllinie erfolgte auf strukturierten Objektträgern, von denen jeweils eine Teilstruktur mit einer ta-C Schicht beschichtet wurde. Die gewonnenen Informationen sollen Rückschlüsse über einen möglichen Einfluss einer ta-C Beschichtung und der verwendeten Strukturen auf die Proliferation der Zelllinie SAOS-2 ermöglichen.

Herstellen der Zellsuspension

Um die aus den Experimenten gewonnenen Erkenntnisse einordnen und untereinander vergleichen zu können, muss am Anfang der Experimente eine Zellsuspension mit identischer Zellkonzentration in jeder Kammer der 4-Well-Platten ausgesät werden. Dazu wurde die Zelllinie SAOS-2 in Zellkulturflaschen bei 37°C und 5% CO₂-Sättigung im Brutschrank kultiviert. Als Nährmedium wurde RPMI-1640 der Firma Biochrome AG verwendet. Diesem Medium sind 10% fetal calf serum (FCS) zugesetzt. Die durch den Stoffwechsel der vitalen Zellen verbrauchte Nährlösung wurde in regelmäßigen Abständen erneuert. Nach 3 Tagen Kultivierung im Brutschrank bildete sich auf der Wachstumsfläche der Zellkulturflasche eine konfluent gewachsene Monolayer-Zellschicht aus. Das Nährmedium wurde aus der Zellkulturflasche entfernt, mit Phosphatpuffer gespült und 1 ml Trypsin dazugegeben und im Brutschrank für 10 Minuten inkubiert. Die Pufferlösung neutralisiert das Medium und ermöglicht die Verwendung von Trypsin. Trypsin ist ein Gemisch aus proteolytisch wirkenden Enzymen. Diese inaktivieren den Adhäsionsmechanismus der Zellen durch eine chemische Reaktion, in der Trypsin die hydrolytische Spaltung extrazellulärer Proteine und Peptide katalysiert, woraufhin sich die Zellen von der Oberfläche ablösen und in den Suspensionszustand übergehen. Die Überprüfung des Adhäsionszustandes der Zellen erfolgte am Lichtmikroskop. Nachdem ausreichend Zellen in der Zellkulturflasche nicht mehr an der Wachstumsfläche adhärert, sondern freibeweglich im Medium gelöst vorlagen, wurden 2ml Medium in die Zellkulturflasche gegeben. Das Medium neutralisiert die katalytische Wirkung des Trypsins. Aus der Zellkulturflasche wurden 20 µl Zellsuspension mit einer Pipette entnommen und eine Zellzahlbestimmung mittels Thoma-Kammer durchgeführt und daraus die Konzentration an Zellen pro µl berechnet. Die Berechnung der Anzahl an Zellen pro µl Zellsuspension ermöglicht es, die Suspensionslösung so zu verdünnen, dass die Anzahl der Zellen, die am Anfang der Experimente in den verwendeten 4-Well-Platten ausgesät und kultiviert werden ca. $n_{\text{SAOS-2}} = 1,0 \cdot 10^5$ Zellen beträgt.

3.2.1 Experimente mit dem Cell Titer Blue Assay

3.2.1.1 Erstellen der Standardkurve

Die Proliferation von Osteosarkomazellen soll unter Verwendung des Cell Titer Blue Assays charakterisiert werden. Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten und die mit der Thoma-Kammer ermittelte Anzahl an Zellen geben Informationen über die Proliferation der Zelllinie im Kultivierungs- und Wachstumszeitraum von 7 Tagen.

Die Kultivierung der Zelllinie SAOS-2 in den 4-Well-Platten der Firma NUNC, erfolgte bei 37°C und 5% CO₂-Sättigung im Brutschrank. Als Nährmedium wurde RPMI-1640 der Firma Biochrome AG verwendet. Diesem Medium sind 10% fetal calf serum (FCS) zugesetzt. Die durch den Metabolismus der vitalen Zellen verbrauchte Nährlösung wurde in regelmäßigen Abständen erneuert. In das Well 1 und Well 2 der 4-Well-Platte wurden $n_{\text{SAOS-2}} = 1,0 \cdot 10^5$ Zellen gegeben und mit 5ml Nährmedium aufgefüllt. Als Adhäsionsfläche wurde die Kunststofffläche des Well 1 verwendet. Parallel dazu erfolgte die Kultivierung im Well 2 auf einem unveränderten Glasobjektträger. Entsprechend dem Untersuchungszeitraum von 7 Tagen, wurden sieben 4-Well-Platten, mit und ohne Glasobjektträger vorbereitet und mit den Zellen kultiviert. Die erste Fluoreszenzmessung wurde nach 24 Stunden durchgeführt, die zweite Messung nach zwei Tagen usw., bis die Messreihe nach 7 Tagen beendet war. Die Zelllinie wurde am jeweiligen Tag der Messung mit dem Cell Titer Blue Assay behandelt. Aus jeder Kammer der 4-Well-Platten, wurde 1 ml Medium entfernt und verworfen. Entsprechend der Versuchsanleitung wurden 0,8 ml Cell Titer Blue zu 4 ml Medium gegeben. Damit die Umsetzung des Farbstoffs Resazurin in Resorufin durch die vitalen Zellen in den Kammern der 4-Well-Platten erfolgen konnte, mussten diese erneut für 3 Stunden im Brutschrank inkubiert werden. Die Fluoreszenzmessungen erfolgten mit dem Fluoreszenzphotometer FluoroskanFL.

Nach Abschluss der Fluoreszenzmessung wurde das Nährmedium mit dem darin befindlichen Farbstoff aus den untersuchten Kammern der 4-Well-Platte entfernt, mit Phosphatpuffer gespült und 1 ml Trypsin dazugegeben und im Brutschrank für 10 Minuten inkubiert. Nachdem ausreichend Zellen in den Kammern der 4-Well-Platten nicht mehr an die Trägerstruktur adhäriert, sondern freibeweglich im Medium gelöst vorlagen, wurden 2ml Medium dazugegeben und anschließend 20 µl

Zellsuspension mit einer Pipette entnommen. Die Zellzahlbestimmung wurde mittels Thoma- Kammer durchgeführt und daraus die Anzahl an Zellen pro Well berechnet.

3.2.1.2 Kultivierung auf strukturierten und/ oder beschichteten Glasobjektträgern

Im Fokus dieses Experiments steht die Untersuchung des Adhäsionsverhaltens und der Proliferation der Zelllinie SAOS-2 auf Objektträgern. Als Adhäsionsflächen wurden entweder nur strukturierte Glasobjektträger oder strukturierte und beschichtete Glasobjektträger verwendet. Die Glasobjektträger sind unter 3.1.6 beschrieben. Die strukturierten und/oder beschichteten Glasobjektträger wurden mit einem Glasschneider entlang der Grenze zwischen beschichteter und unbeschichteter Struktur zerschnitten. Die so erzeugten sechs Teilstrukturen wurden auf zwei 4-Well-Platten verteilt, dies ist mit den dazugehörigen Strukturmustern in Tabelle 2 und Tabelle 3 schematisch dargestellt. Entsprechend den Untersuchungszeiträumen wurden die Objektträger jeweils 1 Tag, 4 Tage und 7 Tage im Brutschrank kultiviert und anschließend eine Fluoreszenzmessung mit dem Fluoreszenzphotometer durchgeführt.

Die zu Beginn der Experimente in jedes Well gegebene Suspension hatte eine Zellzahl von ca. $n_{\text{SAOS-2}} = 1,0 \cdot 10^5$ Zellen. Entsprechend der jeweiligen Kultivierungsdauer wurden die 4-Well- Platten bei 37°C und 5% CO₂- Sättigung im Brutschrank kultiviert. Die 4-Well- Platten wurden aus dem Brutschrank herausgenommen, die 6 Trägerstrukturen mit den adhären SAOS-2 Zellen vorsichtig aus den 4-Well-Platten entfernt und in neue, unbenutzte und mit 4ml neuem Medium aufgefüllte 4-Well- Platten gelegt. Entsprechend der Versuchsanleitung wurde 0,8 ml Cell Titer Blue in die Wells gegeben und 3 Stunden im Brutschrank kultiviert. Anschließend erfolgte die Messung der Fluoreszenzintensität mit dem Fluoreszenzphotometer FluoroskanFL.

Nach Abschluss der Untersuchung erfolgte die Objektträgerreinigung. Zur Ablösung der adhären Zellen wurden die Objektträger in Trypsinlösung 20 Minuten auf einem Rüttler gewaschen, zweimal hintereinander 10 Minuten mit Phosphatpufferlösung gespült und mit 70% Ethanol gereinigt, autoklaviert und für die Messung 2 vorbereitet.

Die zweite Messung erfolgte nach 4 Tagen Kultivierung. Die Zelllinie wurde unter gleichen Bedingungen wie in den vorhergehenden Untersuchungen kultiviert. Die Objektträger wurden mit den adhärenierten Zellen aus den 4-Well- Platten vorsichtig entfernt und in neue, mit 4ml Medium aufgefüllte 4-Well- Platten eingebracht. 0,8 ml Cell Titer Blue wurden zu den 4-Well- Platten dazugegeben, 3 Stunden mit der Zelllinie inkubiert und die Intensität mit dem Fluoreszenzphotometer gemessen. Im Anschluss wurden die Objektträger erneut gereinigt, autoklaviert und für die Kultivierung von 7 Tagen vorbereitet.

Tabelle 2: Verteilung der Strukturen im 4-Well Nr. A

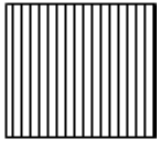
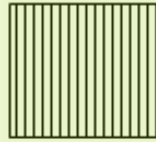
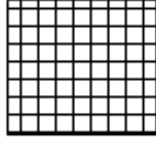

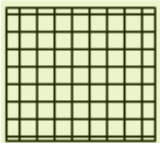
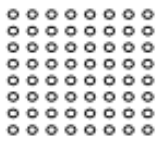
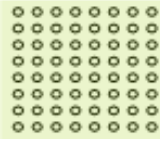

Well 1	Well 2	Well 3	Well 4
			
SAOS-2	SAOS-2	SAOS-2	
Struktur Nr.: 1	Struktur Nr.: 1	Struktur Nr.: 2	Leermessung
unbeschichtet	beschichtet	unbeschichtet	

Tabelle 3: Verteilung der Strukturen im 4-Well Nr. B

Well 1	Well 2	Well 3	Well 4
			
SAOS-2	SAOS-2	SAOS-2	
Struktur Nr.: 2	Struktur Nr.: 3	Struktur Nr.: 3	Leermessung
beschichtet	unbeschichtet	beschichtet	

3.2.2 Experiment mit der Software CellProfiler

In diesem Experiment wird die Proliferation der Zelllinie SAOS-2, unter Verwendung der Fluoreszenzmikroskopie und der digitalen Bildverarbeitungssoftware CellProfiler, hinsichtlich möglicher Einflussfaktoren der ta-C Beschichtung untersucht.

Die Kultivierung der Zelllinie in den 4-Well- Platten der Firma NUNC, erfolgte bei 37°C und 5% CO₂- Sättigung im Brutschrank. Als Nährmedium wurde RPMI-1640 der Firma Biochrome AG verwendet. Diesem Medium sind 10% FCS zugesetzt. Die durch die vitalen Zellen verbrauchte Nährlösung wurde in regelmäßigen Abständen erneuert. In die Kammern der 4-Well- Platte wurden ca. $n_{\text{SAOS-2}} = 5,0 \cdot 10^4$ Zellen gegeben und mit 4ml Nährmedium aufgefüllt. Die strukturierten und/oder beschichteten Glasobjektträger, die unter Kap. 3.1.6 beschrieben und in Abbildung 9 schematisch dargestellt sind, wurden in den 4-Well- Platten mit kultiviert und dienten der Zelllinie SAOS-2 als Adhäsionsfläche. Die Kultivierung der 4-Well- Platten erfolgte jeweils 24 Stunden, 4 Tage und 7 Tage.

Die Fluoreszenzfärbung und Fluoreszenzmikroskopie setzt die Präparation der Zellen voraus. Die Fixierung der Zellen auf den Glasobjektträgern erfolgte mit Formaldehyd. Aus den 4-Well- Platten wurden die Objektträger mit den adhären Zellen herausgenommen und das restlich verbliebene Kulturmedium entfernt. Die Objektträger wurden zweimal mit Phosphatpuffer gewaschen, anschließend mit 2 ml 3,5% Formaldehyd fixiert. Die Einwirkzeit betrug 10 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Glasobjektträger erneut zweimal mit der Pufferlösung gewaschen und anschließend 24 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet.

Die Fluoreszenzfärbung des Zytoskeletts erfolgte mit BodipyFL Phalloidin der Firma Invitrogen. Mit Phosphatpuffer wurden die auf den Objektträgern fixierten Zellen zweimal gewaschen und 3 Minuten mit 0,1% Triton X-100 behandelt. Triton X-100 dient der Permeabilisierung der Zellmembran. Das Triton X-100 wurde aus den Wells entfernt und die Objektträger anschließend erneut mit der Pufferlösung gewaschen. Die Stammlösung (1 mg gelöst in 1,5 ml Methanol) BodipyFL Phalloidin wurde mit Phosphatpuffer im Verhältnis 5:200 und 1% BSA (Bovines Serum Albumin) in die Wells mit den Objektträgern gegeben und 25 Minuten gefärbt. Die Zugabe von BSA verringert unerwünschtes Färben von nicht spezifischen Hintergrundpartikeln. Nach Ablauf der Färbezeit wurden die Objektträger wieder mit Phosphatpuffer gewaschen.

Die Zellkernfärbung erfolgte mit Hoechst 33258 der Firma Invitrogen. Die Objektträger wurden zu Beginn der Zellkernfärbung mit der Pufferlösung gespült und gereinigt. Die Pufferlösung wurde aus den 4-Well-Platten entfernt, anschließend wurde aus der Hoechst 33258 Stammlösung (10mg/ml) eine Verdünnung mit Phosphatpuffer im Verhältnis 1:100 hinzu gegeben und für 15 Minuten gefärbt. Nach Beendigung der Färbezeit wurde die Verdünnung des Fluoreszenzfarbstoffes aus den 4-Well-Platten entfernt und die Objektträger mit Phosphatpufferlösung gewaschen und die Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt.

Zur Ablösung der adhärenierten Zellen wurden die Objektträger in Trypsinlösung 20 Minuten auf einem Rüttler gewaschen, zweimal hintereinander 10 Minuten mit der Pufferlösung gespült und mit 70% Ethanol gereinigt, autoklaviert und für die nächste Kultivierung mit anschließender Fluoreszenzmikroskopie vorbereitet. Die Objektträger wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M untersucht und die digitalen Bilder der Proben am PC gespeichert. Die Bilder wurden mit einer 12-fachen Vergrößerung und einer Auflösung von 2560 x 1920 Pixeln aufgenommen. In die Bilder wurde ein Maßstab eingefügt und anschließend mit der Software CellProfiler analysiert.

4 Ergebnisse

Die Ergebnisse, Diagramme, Fluoreszenzaufnahmen und segmentierten Bilder sind auf der beigelegten CD-Rom enthalten. Die Datei *Master.html* öffnet im Internetbrowser ein Menü mit dem durch den Inhalt der CD navigiert werden kann.

4.1 Untersuchungen mit dem Cell Titer Blue Assay

Die folgenden Abschnitte beschreiben die Ergebnisse zu den Experimenten, durchgeführt mit dem Cell Titer Blue Assay. Untersucht werden das Adhäsionsverhalten und die Proliferation von Osteosarkomazellen SAOS-2. Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten und die mit der Thoma-Kammer ermittelten Zellkonzentrationen geben Informationen über die Proliferation der Zelllinie im Kultivierungs- und Wachstumszeitraum von 7 Tagen.

4.1.1 Erstellen der Standardkurve

Dieser Abschnitt beschreibt die Ergebnisse des unter 3.2.1.1 durchgeführten Experiments. Die detektierten Intensitäten, berechneten Mittelwerte und Standardabweichungen der Fluoreszenz sind in Anlage 1 für die aus Glas oder Kunststoff bestehende Adhäsionsfläche zusammengefasst und in Abbildung 12 visualisiert.

Im Well 1 adhärten die Zellen auf der aus Kunststoff bestehenden Wachstumsfläche der 4-Well-Platte. Die zu Beginn der Experimente in jedes Well gegebene Suspension hatte eine Zellzahl von $n_{\text{SAOS-2}} = 1,0 \cdot 10^5$ Zellen. Nach 24 Stunden Kultivierung im Brutschrank wurde mit dem Cell Titer Blue Assay und dem Fluoreszenzphotometer FluoroskanFL die Intensität bestimmt. Der Mittelwert der detektierten Fluoreszenz beträgt $11,67 \pm 0,43$ FU für das Well 1, die mit der Thoma-Kammer durchgeführte Zellzahlbestimmung ergab eine Anzahl an Zellen von $n_{\text{SAOS-2}} = 3,04 \cdot 10^5$ Zellen/Well. Nach 4 Tagen Kultivierung detektierte das Fluoreszenzphotometer Intensitäten mit einem Mittelwert von $28,81 \pm 1,03$ FU und die Anzahl an Zellen konnte zu $n_{\text{SAOS-2}} = 4,45 \cdot 10^5$ Zellen/Well berechnet werden. Die abschließende Messung, durchgeführt nach 7 Tagen Kultivierung, ergab Intensitäten mit einem

Mittelwert von $96,53 \pm 3,34$ FU und die Anzahl an SAOS-2 Zellen erhöhte sich auf $n_{\text{SAOS-2}} = 9,84 \cdot 10^5$ Zellen/Well.

Im Well 2 adhärten die Zellen auf einem Glasobjektträger, der zu Beginn der Untersuchung in jede 4-Well-Platte gegeben wurde. In der dazugegebenen Zellsuspension waren ca. $n_{\text{SAOS-2}} = 5,0 \cdot 10^4$ Zellen. Nach 24 Stunden Kultivierung wurden Intensitäten mit einem Mittelwert von $11,81 \pm 0,51$ FU registriert und die mit der Thoma-Kammer bestimmte Anzahl an SAOS-2 Zellen betrug $n_{\text{SAOS-2}} = 1,64 \cdot 10^5$ Zellen/Well. Nach 4 Tagen konnten mit dem Fluoreszenzphotometer Intensitäten mit einem Mittelwert von $25,92 \pm 1,38$ FU registriert werden. Die Anzahl an Zellen erhöhte sich auf $n_{\text{SAOS-2}} = 3,75 \cdot 10^5$ Zellen/Well. Nach 7 Tagen erfolgte die abschließende Messung. Der Mittelwert der detektierten Intensitäten beträgt $76,61 \pm 3,36$ FU. Diese Intensität wird von $n_{\text{SAOS-2}} = 8,20 \cdot 10^5$ Zellen/Well hervorgerufen.

Die Proliferation der Zellen im Untersuchungszeitraum kann indirekt über das Intensitätssignal der Fluoreszenz beobachtet werden. Die Metabolisierung des Fluoreszenzfarbstoffes erfolgt ausschließlich durch vitale Zellen, somit entwickelt sich die Intensität des Fluoreszenzsignals proportional zur Anzahl der Zellen in den Wells. Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten und berechneten Zellkonzentrationen bilden die Grundlage des Diagramms in Abbildung 12 auf der folgenden Seite. Das Diagramm stellt die Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Zellkonzentration dar und veranschaulicht die Entwicklung der Intensität in Abhängigkeit von der Anzahl an SAOS-2 Zellen. Die experimentell bestimmten Zellkonzentrationen sind als Punkte in dem Diagramm dargestellt. Der Graph der Zellkonzentration wurde mit einer Ausgleichsrechnung angepasst. Die Ausgleichsrechnung, auch Fitting genannt, ist eine Methode, mit der eine gegebene mathematische Funktion an Datenpunkte angepasst und eine definierte Anzahl von Messdaten durch eine Kurve beschrieben und Restabweichungen minimiert werden können. Die Funktionsanpassung berücksichtigt Messfehler und Abweichungen der Messwerte. Anhand der Fit-Funktion kann die Zellkonzentration der Zelllinien SAOS-2 berechnet und jedem experimentell ermittelten Fluoreszenzwert zugeordnet werden.

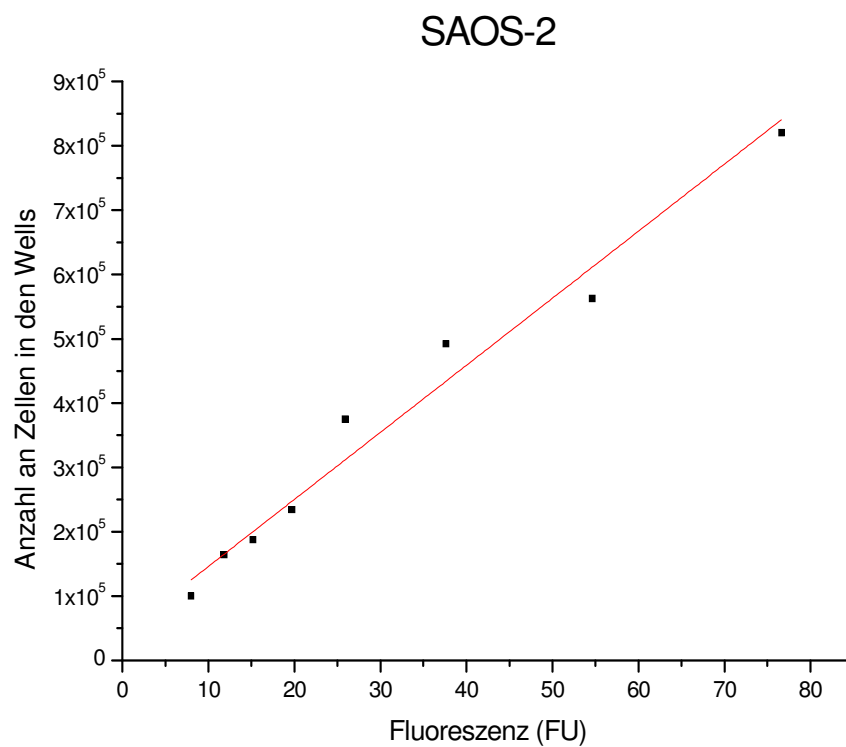


Abbildung 12: Standardkurve – Entwicklung der Fluoreszenz in Abhängigkeit von der SAOS-2 Zellkonzentration.

4.1.2 Kultivierung auf strukturierten und / oder beschichteten Glasobjektträgern

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse des unter 3.2.1.2 durchgeführten Experiments beschrieben. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der mit dem Fluoreszenzphotometer detektierten Intensitäten, sind für die strukturierten und/oder beschichteten Adhäsionsflächen in Anlage 2 zusammengefasst.

Die zu Beginn der Experimente in jedes Well gegebene Suspension hatte eine Zellzahl von ca. $c_{\text{SAOS-2}} = 1,0 \cdot 10^5$ Zellen. Die auf den Objektträgern adhären Zellen wurden jeweils für 3 Stunden mit dem Cell Titer Blue Assay in den 4-Well- Platten inkubiert, die Fluoreszenzintensitäten wurden mit dem Fluoreszenzphotometer FluoroskanFL bestimmt.

Struktur 1 - Linienstruktur

Nach 24 Stunden Kultivierung der Zellen im Brutschrank wurde mit dem Cell Titer Blue Assay und dem Fluoreszenzphotometer FluoroskanFL die Intensität bestimmt. Der Mittelwert der detektierten Fluoreszenz betrug $7,76 \pm 0,49$ FU und die Anzahl an Zellen wurde zu $n_{\text{SAOS-2}} = 1,28 \cdot 10^5$ Zellen berechnet. Nach 4 Tagen Kultivierung ergab sich einen Mittelwert von $11,51 \pm 0,70$ FU und die Anzahl an Zellen betrug $n_{\text{SAOS-2}} = 1,71 \cdot 10^5$ Zellen. Für die nach 7 Tagen Kultivierung durchgeführte Messung ergaben sich Intensitäten mit einem Mittelwert von $23,00 \pm 1,13$ FU, dies entspricht einer Anzahl von $n_{\text{SAOS-2}} = 2,97 \cdot 10^5$ Zellen.

Für den unbeschichteten Objektträger ergab die nach 24 Stunden durchgeführte Messung Intensitäten mit einem Mittelwert von $7,83 \pm 0,50$ FU. Dies entspricht $n_{\text{SAOS2}} = 1,29 \cdot 10^5$ Zellen/Well. Durch Messung 2 wurden Intensitäten mit einem Mittelwert von $10,56 \pm 0,67$ FU detektiert. Die Anzahl an Zellen konnte zu $n_{\text{SAOS-2}} = 1,60 \cdot 10^5$ Zellen berechnet werden. Messung 3 ergab Intensitäten mit einem Mittelwert von $21,41 \pm 1,53$ FU. Dies entspricht $n_{\text{SAOS-2}} = 2,81 \cdot 10^5$ Zellen/Well.

Struktur 2 - Rechteckstruktur

Messung 1 ergab Intensitäten mit dem Mittelwert von $8,09 \pm 0,65$ FU. Die Anzahl an Zellen betrug $n_{\text{SAOS-2}} = 1,31 \cdot 10^5$ Zellen/Well. Messung 2 wurde nach 4 Tagen Kultivierung durchgeführt. Diese ergab den Mittelwert von $12,63 \pm 0,51$ FU, dies

entspricht einer Anzahl an Zellen von $n_{\text{SAOS-2}} = 1,84 \cdot 10^5$ Zellen/Well. Messung 3 entspricht einer Kultivierung von 7 Tagen, es wurde ein Mittelwert von $21,04 \pm 1,63$ FU für die Fluoreszenz detektiert und die Anzahl an Zellen zu $n_{\text{SAOS-2}} = 2,76 \cdot 10^5$ Zellen/Well berechnet.

Für den unbeschichteten Objektträger ergab die Messung 1 einen Mittelwert der Fluoreszenz von $7,84 \pm 0,62$ FU. Die Anzahl an Zellen betrug $n_{\text{SAOS-2}} = 1,29 \cdot 10^5$ Zellen/Well. Nach 4 Tagen Kultivierung erfolgte die Messung 2. Diese ergab den Mittelwert von $10,44 \pm 0,87$ FU. Dies entspricht einer Anzahl an Zellen von $n_{\text{SAOS-2}} = 1,58 \cdot 10^5$ Zellen/Well. Die Messung 3 entspricht einer Kultivierung von 7 Tagen, es wurden Intensitäten mit einem Mittelwert von $22,26 \pm 1,12$ FU registriert. Die Anzahl an Zellen betrug $n_{\text{SAOS-2}} = 2,89 \cdot 10^5$ Zellen/Well.

In den Diagrammen in Abbildung 13 ist die Zellkonzentration der SAOS-2 Zelllinie im Untersuchungszeitraum von 7 Tagen abgebildet. Die strukturierte und/oder beschichtete Struktur 1 und Struktur 2 wurden als Adhäsionsflächen verwendet. Die Zellkonzentration ist in Form von Säulendiagrammen dargestellt.

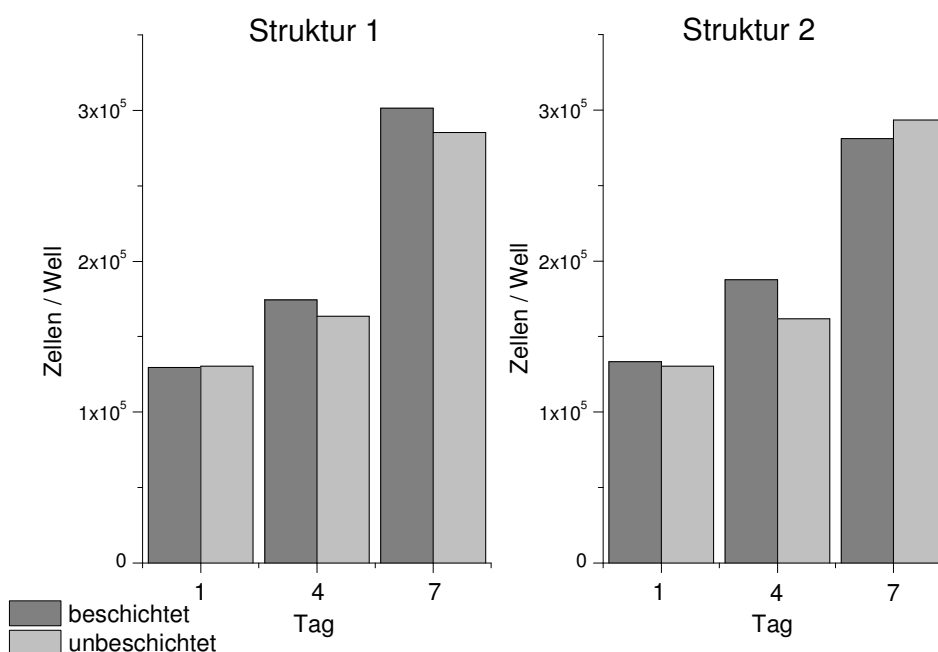


Abbildung 13: Anzahl an SAOS-2 Zellen im Untersuchungszeitraum von 7 Tagen für die Struktur 1 und Struktur 2. Fluoreszenzmessungen mit dem Fluoreszenzphotometer FluoroskanFL.

Struktur 3 - Punktstrukturen

Die nach 24 Stunden Kultivierung durchgeführte Messung 1 ergab Intensitäten mit einem Mittelwert von $7,94 \pm 0,39$ FU. Dies entspricht $n_{\text{SAOS-2}} = 1,31 \cdot 10^5$ Zellen/Well. Nach 4 Tagen Kultivierung erfolgte Messung 2, diese ergab eine mittlere Intensität von $11,50 \pm 0,72$ FU und eine Anzahl an Zellen von $n_{\text{SAOS-2}} = 1,71 \cdot 10^5$ Zellen/Well. Die Messung 3 entspricht einer Kultivierung von 7 Tagen. Es wurden Intensitäten mit einem Mittelwert von $20,17 \pm 0,19$ FU registriert. Dies entspricht $n_{\text{SAOS-2}} = 2,66 \cdot 10^5$ Zellen/Well.

Für den unbeschichteten Objektträger konnten in Messung 1 Fluoreszenzintensitäten mit einem Mittelwert von $8,03 \pm 0,49$ FU detektiert und die Anzahl an Zellen von $n_{\text{SAOS-2}} = 1,31 \cdot 10^5$ Zellen/Well berechnet werden. Nach 4 Tagen Kultivierung erfolgte Messung 2. Diese ergab eine mittlere Intensität von $7,69 \pm 0,51$ FU. Dies entspricht Zellanzahl von $n_{\text{SAOS-2}} = 1,27 \cdot 10^5$ Zellen/Well. Die Messung 3 entspricht einer Kultivierung von 7 Tagen. Es wurden Intensitäten von $25,37 \pm 1,67$ FU registriert, die Anzahl an Zellen beträgt $n_{\text{SAOS-2}} = 3,22 \cdot 10^5$ Zellen/Well.

Kontrolle

Für die *Referenzmessung*, erfolgte die Kultivierung der SAOS-2 Zelllinie auf einem unstrukturiertem und unbeschichteten Glasobjektträger, dieser wurde unter den gleichen Bedingungen wie die anderen Objektträger kultiviert und die Ergebnisse sind im Diagramm unter „Kontrolle“ visualisiert.

In der Messung 1 werden Intensitäten mit einem Mittelwert von $8,06 \pm 0,34$ FU gemessen. Die Anzahl an Zellen beträgt für diese Messung ca. $n_{\text{SAOS-2}} = 1,31 \cdot 10^5$ Zellen/Well. Nach 4 Tagen Kultivierung erfolgte die Messung 2. Diese ergab eine mittlere Intensität von $12,21 \pm 0,81$ FU und eine Zellanzahl von $n_{\text{SAOS-2}} = 1,78 \cdot 10^5$ Zellen/Well. Die Messung 3 entspricht einer Kultivierung von 7 Tagen und es wurde eine Intensität von $26,13 \pm 1,28$ FU und die Anzahl von $n_{\text{SAOS-2}} = 3,31 \cdot 10^5$ Zellen/Well registriert.

In den Diagrammen in Abbildung 14 ist die Zellkonzentration der SAOS-2 Zelllinie auf den strukturierten und/oder beschichteten Adhäsionsflächen der Struktur 3 und der Kontrollmessung im Untersuchungszeitraum von 7 Tagen dargestellt.

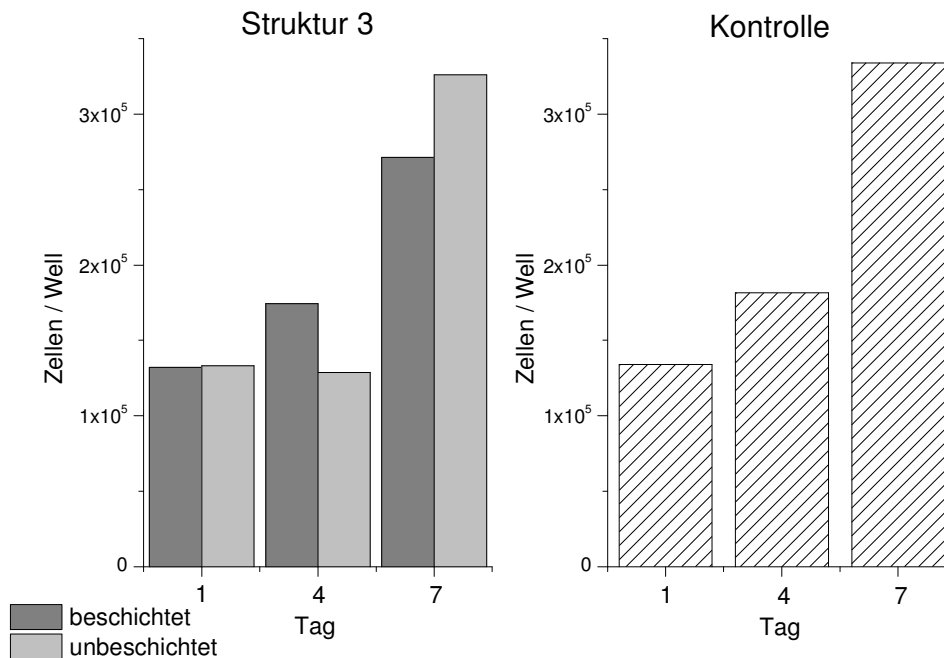


Abbildung 14: Anzahl von SAOS-2 Zellen im Untersuchungszeitraum von 7 Tagen für die Struktur 3 und die Kontrolle. Fluoreszenzmessungen mit dem Fluoreszenzphotometer FluoroskanFL.

Abbildung 15 bis Abbildung 18 auf den folgenden Seiten zeigen Fluoreszenzaufnahmen der Glasobjektträger, auf denen die mehrstündige Kultivierung von SAOS-2 Zellen durchgeführt wurde. Nach der Untersuchung mit dem Cell Titer Blue Assay wurden die Zellen gefärbt und anschließend Fluoreszenzaufnahmen der Strukturen erstellt. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit Hoechst, das Aktin-Skelett der Zellen wurde mit BodipyFL Phalloidin gefärbt. Durch die verwendeten Verfahren zur Färbung der Zellen fluoresziert der Farbstoff, der die Zellkerne durchdrungen hat, im blauen Spektrum des Lichts. Das Zytoskelett bzw. die Fokalkontakte werden im grünen Spektrum sichtbar. Mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops werden beide Spektren getrennt voneinander aufgenommen und die erhaltenen digitalen Bilder können am PC bearbeitet und überlagert werden, so dass der Eindruck einer einzelnen Gesamtaufnahme entsteht. In Abbildung 15 sind die Fluoreszenzaufnahmen der Struktur 1 dargestellt. Die Bilder zeigen die SAOS-2

Zelllinie nach 4 Stunden Kultivierung, auf den beschichteten und unbeschichteten Objektträgern mit der Linienstruktur 1, bei einer 12- fachen Vergrößerung. Aufgrund des Beobachtungsverfahrens befindet sich der Schärfefokus des Bildes in diesem Bildausschnitt auf der Höhe der Plateaus, dadurch erscheinen tiefer liegenden Zellen mit einer Unschärfe. Im linken Bild, welches die beschichtete Struktur abbildet, sind die SAOS-2 Zellen auf den Plateaus sowie in den tiefer gelegenen Zwischenräumen adhäriert. Dies konnte auch für die unbeschichtete Struktur 1 beobachtet werden. In den Fluoreszenzaufnahmen sind die Fokalkontakte, die die Verankerung zwischen Zellen und den Oberflächen herstellen, gut auf den erzeugten Plateaus ausgebildet und zu erkennen. In den Zwischenräumen ist dies aufgrund der Unschärfe nur eingeschränkt sichtbar. Die Anzahl an Zellen, die den Prozess der Adhäsion beendet haben und durch den Cell Titer Blue Test und dem damit verbundenen Mediumwechsel nicht aus der Probe entfernt wurden, ist für die beschichtete und unbeschichtete Struktur 1 annähernd gleich.

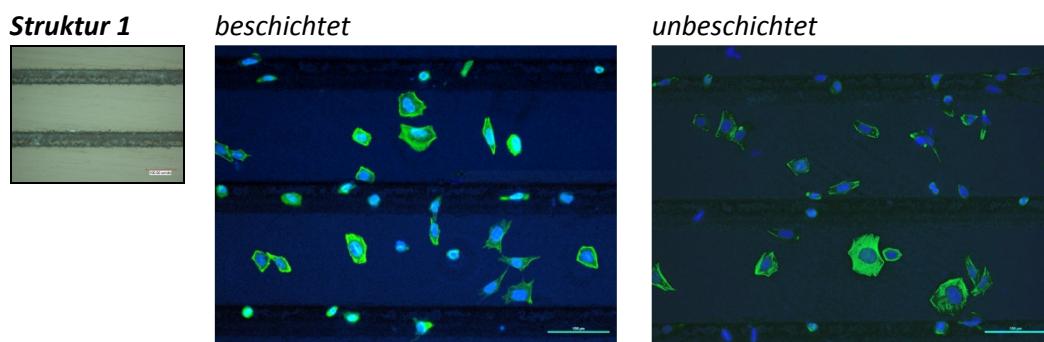


Abbildung 15: Fluoreszenzaufnahmen der Linienstrukturen nach 4 Stunden Kultivierung und anschließender 3- stündiger Inkubation mit dem Cell Titer Blue Assay bei einer 12- fachen Vergrößerung.

Abbildung 16 zeigt die SAOS-2 Zellen auf der beschichteten und unbeschichteten Struktur 2. Die Bilder wurden nach 4 Stunden Kultivierung und anschließender Färbung mit einem Fluoreszenzmikroskop erstellt. Der Schärfefokus der Aufnahmen befindet sich in Höhe der Plateaus der erzeugten Rechteckstrukturen. Die Zwischenräume können aufgrund des Aufnahmeverfahrens in dieser Abbildung nur mit einer Unschärfe dargestellt werden. In beiden Fluoreszenzbildern sind die Fokalkontakte der SAOS-2 Zellen in den Zwischenräumen und auf den Rechteckstrukturen gut zu erkennen. Im linken Bild wird die mit ta-C beschichtete Struktur dargestellt. Die SAOS-2 Zellen adhärten gleichmäßig auf den erzeugten

Rechteckstrukturen sowie in den tiefer gelegenen Zwischenräumen. In diesem Bildausschnitt und bei der gewählten 12- fachen Vergrößerung sind weniger Zellen zu erkennen als im daneben dargestellten Bild, welches die Rechteckstruktur ohne ta-C Schicht zeigt. In dem gewählten Bildausschnitt des rechten Bildes, adhärten die SAOS-2 Zellen ebenfalls gleichmäßig auf den erzeugten Rechteckstrukturen und in den Zwischenräumen.

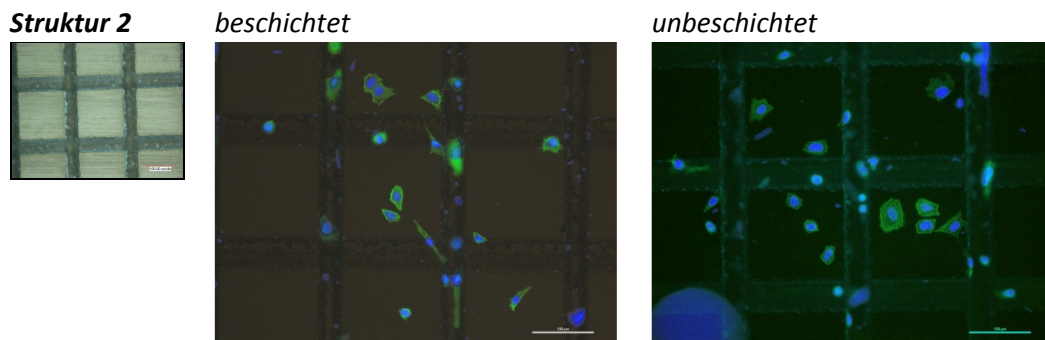


Abbildung 16: Fluoreszenzaufnahmen der Rechteckstruktur nach 4 Stunden Kultivierung und anschließender 3- stündiger Inkubation mit dem Cell Titer Blue Assay bei einer 12- fachen Vergrößerung.

In Abbildung 17 sind die Fluoreszenzaufnahmen der Punktstruktur 3 dargestellt. Die Bilder zeigen die SAOS-2 Zelllinie nach 4 Stunden Inkubation auf den beschichteten und unbeschichteten Objektträgern bei einer 12-fachen Vergrößerung. In beiden Fluoreszenzbildern sind die Fokalkontakte der SAOS-2 Zellen in den Zwischenräumen und auf den Punktstrukturen gut zu erkennen. Die SAOS-2 Zellen adhärten gleichmäßig auf den erzeugten Erhebungen sowie in den tiefer gelegenen Zwischenräumen. Dieses Verhalten konnte für die beschichtete sowie unbeschichtete Struktur 3 beobachtet werden.

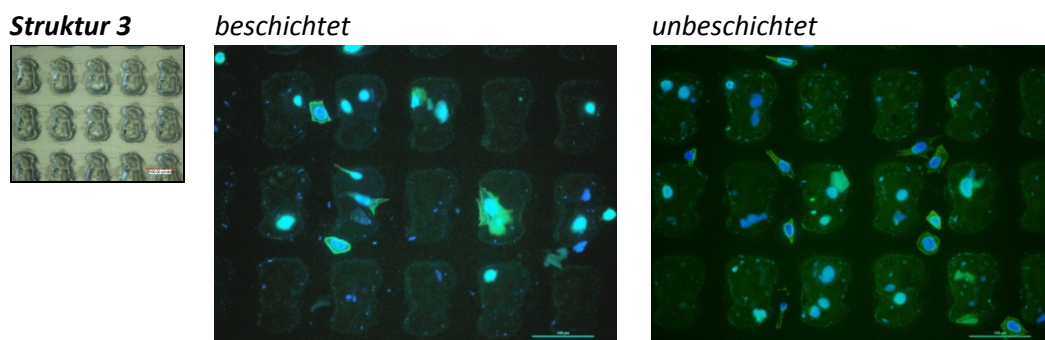


Abbildung 17: Fluoreszenzaufnahmen der Punktstrukturen nach 4 Stunden Kultivierung und anschließender 3- stündiger Inkubation mit dem Cell Titer Blue Assay bei einer 12- fachen Vergrößerung.

In der Abbildung 18 sind die Fluoreszenzaufnahmen der Kontrollmessung dargestellt. Die Bilder zeigen die SAOS-2 Zelllinie nach 4 Stunden Inkubation auf einem unstrukturierten und unbeschichteten Glasobjektträger bei 12- facher Vergrößerung. Die Zellen sind in diesem Bildausschnitt gleichmäßig verteilt, außerdem sind die ausgebildeten Fokalkontakte der SAOS-2 Zellen in diesem Bild gut zu erkennen. Da es sich bei dieser Fluoreszenzaufnahme um einen unstrukturierten und nicht mit einer ta-C Schicht beschichteten Glasobjektträger handelt, adhärirten die SAOS-2 Zellen alle in einer Höhe und es tritt in dieser Aufnahme nicht der Effekt der Tiefenunschärfe auf.

Kontrolle

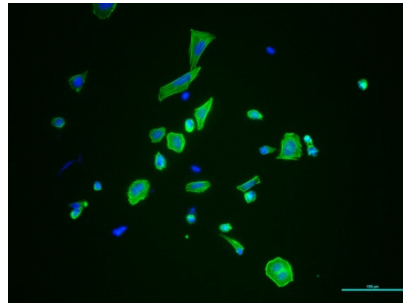


Abbildung 18: Fluoreszenzaufnahme der Kontrolle nach 4 Stunden Kultivierungszeit und anschließender 3- stündiger Inkubation mit dem Cell Titer Blue Assay bei einer 12- fachen Vergrößerung.

4.2 Untersuchungen mit der Software CellProfiler

In diesem Abschnitt sind die Ergebnisse des unter 3.2.2 beschriebenen Experiments zusammengefasst. Der Farbstoff Hoechst wurde für die Zellkernfärbung verwendet, dieser fluoresziert im blauen Spektrum des Lichts. Die Aktinfilamente des Zytoskeletts wurden mit BodipyFL Phalloidin gefärbt und sind im grünen Spektrum sichtbar. Die Spektren können mit der Fluoreszenzmikroskopie getrennt voneinander aufgenommen und in Form digitaler Bilder am PC bearbeitet und gespeichert werden. Durch die Überlagerung beider Spektren entsteht der Eindruck einer einzelnen Gesamtaufnahme.

Das Zellwachstum und die Adhäsion von SAOS-2 Zellen auf unterschiedlich strukturierten und/oder beschichteten Glasobjektträgern wurde 24 Stunden, 4 Tage und 7 Tage beobachtet. Die Objektträger wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M der Firma Carl Zeiss untersucht. Von den Objektträgern wurden zwischen 20 und 25 Bilder von separaten, nicht überlappenden Arealen, jeweils für die beschichteten und unbeschichteten Strukturen erstellt. Die Bilder wurden mit 12-facher Vergrößerung und einer Auflösung von 2560 x 1920 Pixeln aufgenommen und ein Maßstab eingefügt. Bei einer Auflösung von 2560 x 1920 Pixeln und einer 12-fachen Vergrößerung entsprechen 100 µm ca. 392,8 Pixel. Mit einem Pixel werden 0,25 µm dargestellt. Für die Analysen mit der Software CellProfiler wurden die Bilder um den Faktor ¼ auf eine Auflösung von 640 x 480 Pixel reduziert. Mit einem Pixel wird 1 µm dargestellt. Die Zellen und Nuklei wurden anhand morphologischer Größen wie der längsten Achse (MajorAxis) und der kürzesten Achse (MinorAxis), durch die Objekte eingenommene Fläche (AREA) und Formfaktor (FF) vermessen. Die Charakterisierung von unregelmäßig geformten Objekten wird durch den Formfaktor ermöglicht. Der Wert $FF = 1$ steht für ein perfekt kreisförmiges Objekt. Die Messwerte sind in Tabelle 8 in Anlage 4 zusammengefasst.

Die Identifizierung und Segmentierung von Objekten mit der Software ist in Abbildung 19 dargestellt. Die Abbildung 19a zeigt eine Fluoreszenzaufnahme der Kontrolle nach 24h Kultivierung mit SAOS-2 Zellen, die Nuklei und Aktinfilamente werden gemeinsam abgebildet. Es handelt sich um die mit ta-C beschichtete Teilstruktur des Objektträgers. Abbildung 19b zeigt die Fluoreszenzaufnahme nach Analyse mit der Software CellProfiler als Graustufenbild. In dem Graustufenbild sind

die segmentierten Objekte und Outlines der identifizierten Zellen dargestellt. Die identifizierten Nuklei werden nicht abgebildet. Innerhalb der identifizierten Objekte erfolgten die Messungen bezüglich MajorAxis, MinorAxis, Area und Formfaktor jeweils für die segmentierten Zellen und Nuklei.

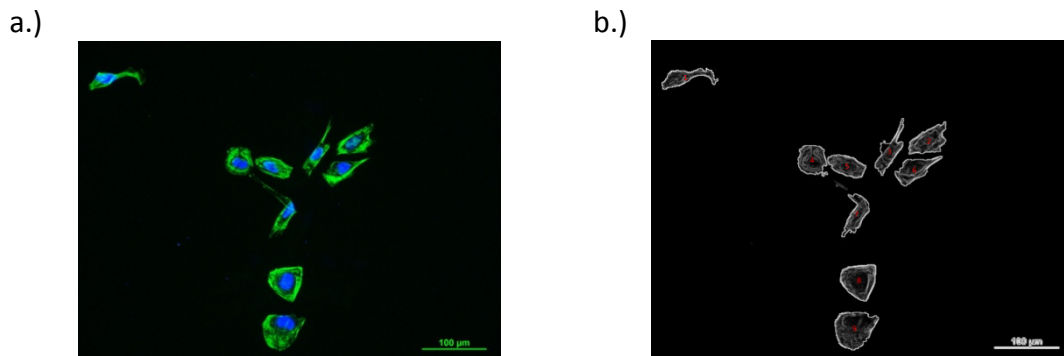


Abbildung 19 a,b: Fluoreszenzaufnahme vor und nach Analyse durch Software CellProfiler mit einer 12-fachen Vergrößerung. **a.)** Fluoreszenzaufnahme nach 1 Tag Kultivierung. Beide Spektren überlagert dargestellt. **b.)** mit Software CellProfiler analysierte Aufnahme, Outlines der identifizierten und segmentierten Objekte (Zellen) sind im Graustufenbild dargestellt.

Die Zellen sind auf den Plateaus und in den tiefer gelegenen Zwischenräumen adhärirt. In den Fluoreszenzaufnahmen sind die Fokalkontakte, mit denen die Zellen an den Oberflächen adhärirten, gut auf den Plateaus ausgebildet und zu erkennen. Dies konnte für alle strukturierten und/oder beschichteten Objektträger im Untersuchungszeitraum beobachtet werden.

Nach 24 Stunden haben sich vereinzelt Zellen zu sogenannten Zellclustern zusammengeschlossen. Die Anzahl an Zellen beträgt zwischen 3 und 15 Zellen pro Cluster. Dies konnte für die beschichteten sowie unbeschichteten Strukturen und die Kontrollen beobachtet werden.

Nach 4 Tagen Kultivierung hat die Anzahl an Zellen zugenommen. Dies wird in den Fluoreszenzaufnahmen sichtbar. In den Fluoreszenzaufnahmen ist eine deutliche Zunahme der Zellcluster zu verzeichnen. Die Zellcluster nehmen eine größere Fläche ein und die Anzahl an Zellen, die diese Cluster bilden ist angestiegen.

In den Fluoreszenzaufnahmen, die nach 7 Tagen Kultivierung erstellt wurden, sind kaum noch einzelne Zellen zu erkennen. Die Zellen sind auf den Plateaus und in den Strukturzwischenräumen adhärirt und gewachsen. Die Anzahl an vermessenen Zellen pro Bild ist gestiegen. Die ausgebildeten Zellcluster wachsen über die

Strukturen hinweg bzw. hinein. Dies konnte für alle strukturierten und/oder beschichteten Objektträger beobachtet werden. In der Tabelle 9 in Anlage 4 sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der durch die Zellen und Nuklei eingenommenen Fläche (AREA) zusammengefügt. Diese Messwerte charakterisieren die Entwicklung der Zellen, Zellcluster und Nuklei für die Strukturen im Verlauf des Experiments.

Struktur 1 - Linienstruktur

Im Untersuchungszeitraum von 7 Tagen wurden für die beschichtete Struktur 1 56 Fluoreszenzaufnahmen erstellt. Die Analyse der unbeschichteten Struktur erfolgte aus 61 Fluoreszenzaufnahmen. Nach 24 Stunden Kultivierung wurde für die strukturierte und beschichtete bzw. unbeschichtete Linienstruktur $n = 164$ Zellen identifiziert und segmentiert. Nach 4 Tagen Kultivierung wurden jeweils $n = 327$ Zellen und nach 7 Tagen jeweils $n = 765$ adhärenzte Zellen für die beschichtete und unbeschichtete Teilstruktur des Glasobjektträgers analysiert und vermessen. Die Ergebnisse der MajorAxis und MinorAxis sind in der folgenden Tabelle 4 zusammengefasst. Die Ergebnisse der durch die Zellen und Nuklei eingenommenen Fläche sind in Anlage 4 Tabelle 9 zusammengetragen.

Tabelle 4: Ergebnisse Struktur 1 - Linienstruktur (MajorAxis / MinorAxis)

Struktur	Kategorie	Tag	Nuklei				Zellen			
			beschichtet		unbeschichtet		beschichtet		unbeschichtet	
			WERT	STDW	WERT	STDW	WERT	STDW	WERT	STDW
Struktur 1	MajorAxis in μm	1	18,83	5,47	18,66	6,55	50,82	14,24	51,61	14,36
		4	19,74	6,73	20,62	6,40	60,72	16,63	56,13	14,03
		7	22,78	7,17	26,68	7,04	50,34	13,44	53,63	13,08
	MinorAxis in μm	1	12,64	3,09	12,05	4,54	30,54	7,60	32,15	8,93
		4	13,20	4,17	13,68	4,63	35,06	10,02	33,83	8,61
		7	15,37	4,55	17,45	4,58	30,34	7,85	33,00	7,62

Die Abweichungen der Mittelwerte MajorAxis_{Zellen} – beschichtet zum Mittelwert der unbeschichteten Teilstruktur betragen zwischen 2% und 8%. Der Mittelwert MinorAxis_{Zellen} variiert ca. 4% bis 9% zwischen beschichteter und unbeschichteter Teilstruktur. Die Abweichungen der Area variieren zwischen 9% und 12%. Diese Abweichungen konnten in den gleichen Größenordnungen auch für die Messwerte

der Nuklei beobachtet werden. Die Abweichung der MajorAxis_{Nuklei} zwischen beschichteter und unbeschichteter Struktur variiert zwischen 1% und 9%. Die Mittelwerte der MinorAxis_{Nuklei} weichen zwischen 5% und 12% voneinander ab und die Abweichungen für die Mittelwerte der Area betragen zwischen 4% und 22%. Der Formfaktor der Nuklei beträgt 0,79 und stellt damit eine ovale bis fast kreisrunde Form dar.

Struktur 2 - Rechteckstruktur

Von der beschichteten Teilstruktur des Glasobjektträgers wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop 64 Fluoreszenzaufnahmen und für die unbeschichtete Teilstruktur 65 Fluoreszenzaufnahmen erstellt. Auf diesen Bildern konnten nach 24 Stunden Kultivierung jeweils n = 99 SAOS-2 Zellen segmentiert werden. Nach 4 Tagen Kultivierung wurden jeweils n = 301 Zellen identifiziert. Nach 7 Tagen Kultivierung wurden jeweils n = 640 adhärenzte Zellen für die beschichtete und unbeschichtete Teilstruktur des Glasobjektträgers analysiert und vermessen. Die Ergebnisse der MajorAxis und MinorAxis sind in der folgenden Tabelle 5 zusammengefasst. Die Ergebnisse der durch die Zellen und Nuklei eingenommenen Fläche sind in Anlage 4 Tabelle 9 zusammengetragen.

Tabelle 5: Ergebnisse Struktur 2 - Rechteckstruktur (MajorAxis / MinorAxis)

Struktur	Kategorie	Tag	Nuklei				Zellen			
			beschichtet		unbeschichtet		beschichtet		unbeschichtet	
			WERT	STDW	WERT	STDW	WERT	STDW	WERT	STDW
Struktur 2	MajorAxis in µm	1	21,51	4,58	23,42	10,28	51,38	10,77	51,12	14,51
		4	24,86	7,19	28,04	8,44	58,82	16,90	55,83	14,33
		7	22,51	6,52	22,29	7,78	50,61	11,77	50,39	13,31
	MinorAxis in µm	1	15,55	3,99	14,93	6,38	32,86	8,79	32,65	9,29
		4	17,84	5,10	18,07	5,44	35,93	9,32	32,87	8,22
		7	15,90	5,05	15,00	5,69	31,52	7,48	30,64	6,82

Die Abweichungen zwischen dem Mittelwert der MajorAxis_{Zellen} - beschichtet und dem der unbeschichteten Teilstruktur beträgt zwischen 0,5% und 6%. Die Werte der MinorAxis_{Zellen} weichen zwischen 0,6% und 9% voneinander ab. Die Abweichungen der Mittelwerte der vermessenen Area variieren zwischen 4% und 16%. Diese Abweichungen konnten in den gleichen Größenordnungen auch für die Messwerte

der Nuklei beobachtet werden. Die Abweichung der MajorAxis_{Nuklei} zwischen beschichteter und unbeschichteter Struktur variiert zwischen 9% und 12%. Die Mittelwerte der MinorAxis_{Nuklei} weichen zwischen 4% und 6% voneinander ab und die Abweichungen für die Mittelwerte der Area betragen zwischen 6% und 11%.

Im Diagramm unter Abbildung 20 sind die für die Struktur 1 und die Struktur 2 berechneten Mittelwerte und Standardabweichungen der MajorAxis_{Zellen} im Untersuchungszeitraum von 7 Tagen, dargestellt. Die berechneten Mittelwerte und Standardabweichungen der Ergebnisse zu den mit der Software durchgeführten Untersuchungen sind in Anlage 4 zusammengefasst.

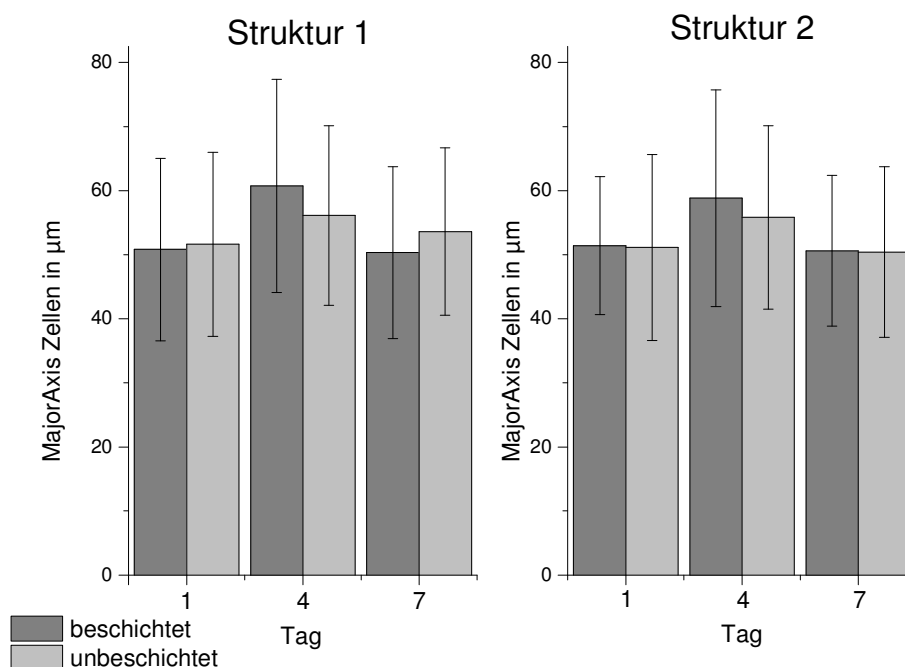


Abbildung 20: Darstellung der MajorAxis der Zellen als Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen im Untersuchungszeitraum von 7 Tagen für die Struktur 1 und Struktur 2.

Struktur 3 - Punktstruktur

Im Untersuchungszeitraum von 7 Tagen wurden für die beschichtete Struktur 3 59 Fluoreszenzaufnahmen erstellt. Die Analyse der unbeschichteten Struktur erfolgte aus 67 Fluoreszenzaufnahmen. Nach 24 Stunden Kultivierung wurden in den Fluoreszenzaufnahmen $n = 221$ Zellen für die beschichtete und unbeschichteten Struktur 3 segmentiert. Nach 4 Tagen Kultivierung wurden jeweils $n = 444$ Zellen

identifiziert und segmentiert. Nach 7 Tagen Kultivierung konnten in den Fluoreszenzaufnahmen jeweils $n = 1144$ SAOS-2 Zellen identifiziert und segmentiert werden. Die Ergebnisse der MajorAxis und MinorAxis sind in der folgenden Tabelle 6 zusammengefasst. Die Ergebnisse der durch die Zellen und Nuklei eingenommenen Fläche sind in Anlage 4 Tabelle 9 zusammengetragen.

Tabelle 6: Ergebnisse Struktur 3 - Punktstruktur (MajorAxis / MinorAxis)

Struktur	Kategorie	Tag	Nuklei				Zellen			
			beschichtet		unbeschichtet		beschichtet		unbeschichtet	
			WERT	STDW	WERT	STDW	WERT	STDW	WERT	STDW
Struktur 3	MajorAxis in μm	1	19,92	7,53	22,32	6,63	44,87	11,14	47,21	13,31
		4	21,90	5,27	25,87	7,21	51,57	13,18	51,64	14,32
		7	19,67	5,29	25,63	6,91	46,91	13,26	43,80	13,04
	MinorAxis in μm	1	13,93	5,58	14,42	4,27	27,04	6,57	27,64	6,96
		4	14,72	3,53	16,32	4,29	30,53	7,79	28,86	7,80
		7	13,71	3,48	16,57	4,36	28,76	6,93	25,57	6,92

Die Abweichung der Mittelwerte MajorAxis_{Zellen} – beschichtet, beträgt zwischen 0,2% und 5% zum Mittelwert der unbeschichteten Teilstruktur. Die Abweichungen der Mittelwerte der MinorAxis_{Zellen} variieren zwischen 3% und 12%. Der Mittelwert der Area variiert ca. 6% bis 10% zwischen beschichteter und unbeschichteter Teilstruktur. Diese Abweichungen konnten in den gleichen Größenordnungen auch für die Messwerte der Nuklei beobachtet werden. Die Abweichung der MajorAxis_{Nuklei} zwischen beschichteter und unbeschichteter Struktur variiert zwischen 11% und 24%. Die Mittelwerte der MinorAxis_{Nuklei} weichen zwischen 4% und 12% voneinander ab und die Abweichungen für die Mittelwerte der Area betragen zwischen 8% und 35%.

Kontrolle

Für den beschichteten Teil des unstrukturierten Glasobjektträgers wurden im Untersuchungszeitraum von 7 Tagen 60 Fluoreszenzaufnahmen und für den unbeschichteten Teil des Objektträgers 61 Fluoreszenzaufnahmen erstellt. In diesen Aufnahmen konnten nach 24 Stunden jeweils $n = 235$ adhärierte Zellen und nach 4 Tagen Kultivierung $n = 477$ Zellen segmentiert werden. Zum Ende der Untersuchung ergab die Analyse der erstellten Bilder eine Anzahl an SAOS-2 Zellen von $n = 1613$, die durch die Software CellProfiler segmentiert und vermessen werden konnten. Die

Ergebnisse der MajorAxis und MinorAxis sind in der folgenden Tabelle 7 zusammengefasst. Die Ergebnisse der durch die Zellen und Nuklei eingenommenen Fläche sind in Anlage 4 Tabelle 9 zusammengetragen.

Tabelle 7: Ergebnisse Kontrolle (MajorAxis / MinorAxis)

Struktur	Kategorie	Tag	Nuklei				Zellen			
			beschichtet		unbeschichtet		beschichtet		unbeschichtet	
			WERT	STDW	WERT	STDW	WERT	STDW	WERT	STDW
Kontrolle	MajorAxis in μm	1	28,39	6,61	25,13	6,24	62,83	20,22	51,51	12,63
		4	28,20	7,31	27,79	7,92	66,00	20,36	57,88	15,10
		7	27,73	6,08	28,57	6,34	61,14	16,59	52,36	14,26
	MinorAxis in μm	1	18,30	4,32	17,27	4,44	29,54	8,45	31,49	7,74
		4	18,53	4,30	18,36	4,79	35,95	9,90	34,82	8,63
		7	17,58	3,37	18,40	3,59	33,29	7,78	32,11	8,16

Die Abweichungen zwischen dem Mittelwert der MajorAxis_{Zellen} - beschichtet und dem der unbeschichteten Teilstruktur beträgt zwischen 15% und 19%. Die Abweichungen der Mittelwerte der MinorAxis_{Zellen} variieren zwischen 4% und 8%. Der Mittelwert der Area variiert ca. 8% bis 13% zwischen beschichteter und unbeschichteter Teilstruktur. Die Abweichung der MajorAxis_{Nuklei} zwischen beschichteter und unbeschichteter Struktur variiert zwischen 3% und 12%. Die Mittelwerte der MinorAxis_{Nuklei} weichen zwischen 0,1% und 5% voneinander ab und die Abweichungen für die Mittelwerte der Area betragen zwischen 2% und 16%. Die Abbildung 21 zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen der MajorAxis der Zellen im Untersuchungszeitraum von 7 Tagen für Struktur 3 und die Kontrolle, in Form eines Diagrammes. Die Ergebnisse der mit der Software durchgeführten Untersuchungen sind in Anlage 4 zusammengefasst.

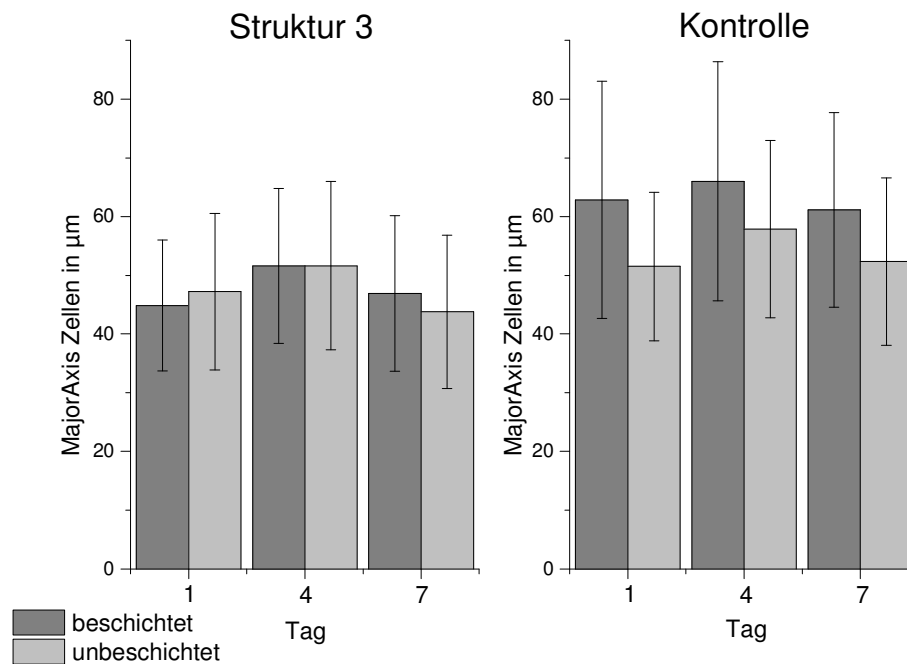


Abbildung 21: Darstellung der MajorAxis der Zellen als Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen im Untersuchungszeitraum von 7 Tagen für die Struktur 3 und Kontrolle.

Die Charakterisierung von unregelmäßig geformten Objekten wird durch den Formfaktor ermöglicht. Der Wert $FF = 1$ steht für ein perfekt kreisförmiges Objekt. Die Analysen der Software CellProfiler sind in Form von Mittelwerten und Standardabweichungen in Anlage 4, Tabelle 8 zusammengefasst. Die Analyse der Fluoreszenzaufnahmen ergab für die segmentierten Nuklei der beschichteten Teilstruktur des Objektträgers 1 einen Formfaktor mit dem Mittelwert von $FF = 0,79$. Die Abweichung zum Mittelwert der unbeschichteten Teilstruktur beträgt 7%. Der Formfaktor der Zellen beträgt $FF = 0,51$ und weicht um 2% von der unbeschichteten Teilstruktur ab.

Für die beschichtete Teilstruktur des Objektträgers 2 beträgt der Formfaktor der Nuklei $FF = 0,81$, der Mittelwert der unbeschichteten Teilstruktur fällt um 12% geringer aus. Für die auf Struktur 2 adhärenen Zellen beträgt der Formfaktor $FF = 0,57$ und die Abweichung zum Mittelwert der unbeschichteten Teilstruktur beträgt 13%.

Der Formfaktor der Nuklei für die beschichtete Teilstruktur 3 beträgt 0,79 und weicht um 9% von dem der unbeschichteten Teilstruktur ab. Die Analyse ergab für die

adhärierten Zellen einen Formfaktor von $FF = 0,55$. Dieser Wert weicht um 16% vom Formfaktor der unbeschichteten Teilstruktur ab.

Für die Kontrolle konnte der Formfaktor der Nuklei für den beschichteten Teil des Objektträgers zu 0,79 berechnet werden. Die Abweichung zum unbeschichteten Teil beträgt 0,7%. Der Formfaktor der Zellen beträgt $FF = 0,57$ und weicht um 18% vom Formfaktor der Zellen ab, die auf dem unbeschichteten Teil des Objektträgers adhärierten.

5 Diskussion

5.1 Charakterisierung der Proliferation mit dem Cell Titer Blue Assay

5.1.1 Standardkurve

Dieser Abschnitt diskutiert die Ergebnisse des unter 3.2.1.1 durchgeführten Experiments zum Erstellen einer Standardkurve, die den Zusammenhang zwischen Fluoreszenz und Zellkonzentration verdeutlichen soll. Die Kultivierung der Zelllinie erfolgte auf der aus Kunststoff bestehenden Wachstumsfläche einer NUNC 4-Well-Platte sowie einem unbeschichteten und unstrukturiertem Glasobjektträger. Die Fluoreszenzintensitäten sind mit dem Cell Titer Blue Assay und dem Fluoreszenzphotometer FluoroskanFL gemessen worden. Die berechneten Mittelwerte und Standardabweichungen der gemessenen Intensitäten, sind in Anlage 1 zusammengefasst und in Form eines Diagrammes visualisiert.

Kultivierung auf Wachstumsfläche

Im Untersuchungszeitraum von 7 Tagen lässt sich ein ansteigender, exponentieller Trend der gemessenen Intensitäten erkennen. Die Fluoreszenz entwickelte sich proportional zur Zellkonzentration. Die Fluoreszenzmessung, durchgeführt nach 24 Stunden Kultivierung, verzeichnete einen leichten Anstieg in der Intensität. Dies wurde auch für die nach 5 Tagen durchgeführte Fluoreszenzmessung beobachtet. Der größte Anstieg in der Intensität ist erwartungsgemäß zum Ende der Untersuchung registriert worden. Der Anstieg ist auf die spezifische Verdopplungsrate der Zelllinie zurückzuführen. Die zu Beginn der Experimente in jedes Well gegebene Suspension hatte eine Zellzahl von $n_{\text{SAOS-2}} = 1,0 \cdot 10^5$ Zellen. Unter idealen Kultivierungsbedingungen besitzt die Zelllinie einen spezifischen Verdopplungszeitraum von 43 Stunden. Dies wird durch die Messwerte bestätigt und im Diagramm unter Abbildung 22 in Anlage 1 sichtbar. Die gemessenen Intensitäten entwickeln sich proportional zur exponentiell steigenden Anzahl von Zellen in den Wells.

Das DSMZ Informationsblatt gibt die ideale Ausgangskonzentration für die Kultivierung von SAOS-2 Zellen mit $1,0 - 2,0 \cdot 10^6$ Zellen pro 80 cm^2 Adhäsionsfläche

an. Dieses Verhältnis von Zellen pro cm^2 gewährleistet ein homogenes Wachstum der Zellen auf den Adhäsionsflächen bis hin zur Konfluenz. Die in diesem Versuchsaufbau verwendeten 4-Well-Platten haben die Abmessungen von 78,0 mm Länge und 27,9 mm Breite. Damit beträgt die Adhäsionsfläche der SAOS-2 Zellen ca. $21,7 \text{ cm}^2$. Die Anzahl an Zellen, zur Aussaat in den Wells betrug $n_{\text{SAOS-2}} = 1,0 \cdot 10^5$ Zellen/Well. Die für diesen Versuch gewählte Aussaatdichte fällt im Verhältnis zur Größe der Fläche geringer aus, als durch die DSMZ empfohlen, da die Zellkonfluenz erst nach 7 Tagen erreicht werden soll. Durch die geringe Aussaatdichte liegen die Intensitäten der ersten Messung im Bereich des Hintergrundrauschens. Das durch die Zellen umgesetzte Resazurin fällt in der Menge zu gering aus und kann nicht von der Eigenfluoreszenz des Mediums differenziert werden. Die berechneten Zellkonzentrationen unterliegen starken Schwankungen. Da die Fluoreszenzintensitäten jedoch ansteigen, können diese Schwankungen auf Fehler in der Bestimmung der Zellanzahl mittels Thoma-Kammer und abweichenden Konzentrationen in den Suspensionslösungen, die zur Aussaat der Zelllinie in den 4-Well-Platten verwendet wurden, zurückgeführt werden.

Kultivierung mit Glasobjektträger

In Anlage 1 sind die aus den Messergebnissen berechneten Mittelwerte und Standardabweichungen zur Untersuchung der Proliferation der Zelllinie SAOS-2 auf einem unstrukturierten und unbeschichteten Glasobjektträger zusammengetragen. Im 7 Tage Vergleich weisen die gemessenen Intensitäten einen exponentiellen Trend auf. Die nach den Fluoreszenzmessungen durchgeführten Zellzahlbestimmungen mittels Thoma-Kammer und Lichtmikroskop bestätigen ein exponentielles Wachstum der Zellen in den Wells im Zeitraum der Untersuchung. Der Verlauf der Intensitäten und die aus den Versuchen berechneten Zellkonzentrationen lassen sich mit der spezifischen Verdopplungsrate erklären. Jede Messung wurde mit 24 Stunden Zeitdifferenz zur vorhergehenden Messung durchgeführt. Der Verdopplungszeitraum beträgt für die Zelllinie SAOS-2 43 Stunden. Die Zellen in Kultur erreichen somit zu jedem zweiten Messpunkt eine Verdopplung in der Anzahl. Dies spiegelt sich im Verlauf des Graphen wieder, der die Intensität in Abbildung 22 in Anlage 1 visualisiert.

Vergleich zwischen Kunststoff und Glas

Ein Bestandteil der Aufgabenstellung des unter 3.2.1.1 durchgeführten Versuches ist es, die Proliferation der Zelllinie SAOS-2 auf einem Glasobjektträger und einer Kunststoffoberfläche auf eine mögliche Korrelation hin zu untersuchen und daraus einen Zusammenhang zwischen Fluoreszenz und Zellkonzentration abzuleiten.

Die Experimente ergaben für die aus Kunststoff bestehende Wachstumsfläche und den Glasobjektträger einen exponentiellen Anstieg der Fluoreszenz und Zellkonzentration. In den ersten vier Messungen bilden sich für die unterschiedlichen Adhäsionsflächen nur geringe Unterschiede in den Fluoreszenzintensitäten heraus. Die Zellkonzentrationen zwischen der Kultivierung auf Glasobjektträger und der Kultivierung auf Kunststoffoberfläche entwickeln sich annähernd identisch. Im weiteren Verlauf der Experimente weichen die gemessenen Intensitäten stärker voneinander ab. Dies wird durch die Zellkonzentrationen bestätigt. Die nach den Fluoreszenzuntersuchungen mit der Thoma-Kammer durchgeführten Zellzahlbestimmungen ergaben für die Kunststoffoberfläche höhere Konzentrationen an Zellen. Aufgrund der höheren Zellkonzentrationen und gemessenen Intensitäten auf Kunststoffoberflächen scheinen diese für die Zellproliferation, im Vergleich zu Glasobjektträgern vorteilhafter zu sein. Diese Abweichungen können jedoch auch durch Ungenauigkeiten in der Ausgangskonzentration und Zellzahlbestimmung hervorgerufen werden. Aufgrund des Verfahrens sind die Suspensionslösungen zur Aussaat in den Wells nur mit Abweichungen zueinander herzustellen. Die Zellzahlbestimmung wurde mit der Thoma-Kammer durchgeführt. Dieses Verfahren basiert auf einer Mittelwertbildung und die daraus resultierende Zellzahlbestimmung ist mit Ungenauigkeiten verbunden. Die mit einem Fehler behaftete Anzahl an Zellen ist wiederum Grundlage der Berechnungen für die Konzentration der Suspensionslösung zur Aussaat in den Wells. Aufgrund des langen Untersuchungszeitraumes und der zellspezifischen Verdopplungsrate der Zelllinie setzt sich dieser Fehler durch den gesamten Versuch fort und wird mit jeder Zellverdopplung alle 43 Stunden potenziert. Daher kann nicht zuverlässig bestätigt werden, dass die Abweichungen der Intensitäten zwischen Kultivierung mit Objektträger und Kultivierung auf Kunststoffoberfläche in den Messungen 1 bis 7 der Abbildung 22 in der Anlage 1 ausschließlich auf fördernde bzw. hemmende

Eigenschaften der verwendeten Adhäsionsflächen zurückzuführen sind. Ein weiterer Einflussfaktor auf das Adhäsionsverhalten und der damit eng verbunden Proliferation von Zellen sind die hydrophoben Eigenschaften der Glasobjektträgeroberfläche. Der Einfluss von hydrophilen Flächen auf den Prozess der Adhäsion wurde unter 2.2.2 erläutert. Dies würde ebenfalls zu einer höheren Intensität der Fluoreszenz in den Kammern führen, in denen eine Kultivierung ohne Glasobjektträger durchgeführt wurde und könnte die höher ausfallenden Messwerte gegenüber der Vergleichskultur hervorrufen. Um dies überprüfen zu können, müssten alternative Versuchsanordnungen aufgebaut werden.

Die Objektträger besitzen nicht die identischen Abmessungen der verwendeten 4-Well-Platten, sondern fallen wesentlich kleiner aus. Daher muss davon ausgegangen werden, dass die Zellen nicht nur auf dem Glasobjektträger adhärten, sondern auch auf den größer ausfallenden Kunststoffflächen der 4-Well-Platten, in die die Glasobjektträger zur Kultivierung gelegt wurden. Aufgrund des Versuchsaufbaus tragen diese Zellen ebenfalls zum Fluoreszenzsignal bei und können nicht vom Intensitätssignal der auf der Glasobjektträgeroberfläche adhärten Zellen differenziert werden.

5.1.2 SAOS-2 Kultivierung auf strukturierten und / oder beschichteten Glasobjektträgern

Die Proliferation der Zelllinie SAOS-2 wurde auf strukturierten und/oder beschichteten Glasobjektträgern untersucht. In Kapitel 3.1.6 sind die auf die Objektträgeroberfläche aufgebrachten Strukturen, deren Abmessungen sowie die zur Herstellung verwendeten Prozessparameter abgebildet und beschrieben. Die Zelllinie ist unter identischen Bedingungen wie in den zuvor durchgeführten Versuchen, 7 Tage kultiviert worden. Anschließend erfolgten 3 Messungen. Diese wurden nach 1 Tag, 4 Tagen und 7 Tagen Kultivierung durchgeführt. Im Kapitel 4.1.2 ist der Versuch beschrieben. Die Ergebnisse sind in Anlage 2 in Form von Mittelwerten und den dazugehörigen Standardabweichungen zusammengetragen.

Struktur 1 - Linienstruktur

Die in die Objektträgeroberfläche eingebrachten Linienstrukturen besitzen die Periode 200 μm , Linienbreite 50 μm und Tiefe 15-25 μm . Ein Teil der Strukturen wurde mit einer 100 nm dicken ta-C Schicht beschichtet.

Die Zellkonzentrationen entwickelten sich für die beschichtete und unbeschichtete Struktur annähernd gleich. In Messung 1 kann keine eindeutige Zellkonzentration aus den Fluoreszenzintensitäten abgeleitet werden. Die durch die vitalen Zellen hervorgerufene Reduktion des Farbstoffs Resazurin in Resorufin und die daraus resultierende Fluoreszenzintensität der Zellsuspension reicht nicht aus, um von der durch die Eigenfluoreszenz des Mediums hervorgerufenen Intensität differenziert zu werden. Da den Zellen keine Intensität zugeordnet werden kann, ist die Ableitung einer Zellkonzentration aus der Fluoreszenzintensität für diese Messung nicht eindeutig. Dies betrifft die mit ta-C beschichteten und unbeschichteten Glasobjektträger. Ein leichter Anstieg in der Zellkonzentration wird ab Messung 2, dies entspricht einer Kultivierung von 4 Tagen, für die beschichtete und unbeschichtete Struktur 1 festgestellt. Nach diesem Kultivierungszeitraum hat sich theoretisch die Anzahl an Zellen gegenüber der Anfangszellzahl verdoppelt. Die Zellkonzentration der mit ta-C beschichteten Struktur ist um 7% gegenüber der unbeschichteten Struktur erhöht. Ein sprunghafter Anstieg in der Zellkonzentration

kann für die Messung 3 beobachtet werden. Im Vergleich zur Messung 2 erfolgte eine annähernde Verdopplung der registrierten Fluoreszenzintensität, die auf die spezifische Verdopplungsrate der Zelllinie zurückzuführen ist. Dies kann für die beschichteten und unbeschichteten Objektträger beobachtet werden. Nach 7 Tagen Kultivierung, ergaben die Untersuchungen eine geringfügig höhere Zellkonzentration (6%) auf dem mit ta-C beschichteten Objektträger, verglichen mit der Zellkonzentration des unbeschichteten Objektträgers. Die Mittelwerte für die Zellkonzentrationen der Referenzmessung fallen um 3% höher aus, als die Zellkonzentration der Struktur 1. Die erhöhten Zellkonzentrationen für die beschichtete Struktur 1 im gesamten Untersuchungszeitraum scheinen darauf hinzudeuten, dass eine ta-C Beschichtung der Struktur 1 positive Auswirkungen auf die Proliferation der Zelllinie hat. Eine mögliche Erklärung dafür ist, der Prozess der Objektträgerbearbeitung. Dieser setzt sich aus zwei Bearbeitungsschritten zusammen. Im ersten Bearbeitungsschritt wurden die Strukturen in die Glasobjektträgeroberfläche mit einem Laser eingebracht. Dieses Verfahren verändert zum einen die Oberflächenrauheit des Substrates, es werden Fehlstellen in der Oberfläche erzeugt und zum anderen wird die Oberflächenspannung verändert. Im zweiten Bearbeitungsschritt werden die eingebrachten Strukturen mit einer 100 nm dicken ta-C Schicht beschichtet. Dies hat wiederum zur Folge, dass die im ersten Schritt veränderten Oberflächenspannungen des Glasobjektträgers erneut verändert werden und die durch den Materialbearbeitungsprozess eingebrachten Fehlstellen in der Oberfläche durch das Aufbringen einer homogenen ta-C Schicht ausgeglichen werden. Dies könnte zu einer verbesserten Proliferation der Zelllinie auf den mit ta-C beschichteten Teil des Glasobjektträgers führen. Jedoch können diese Abweichungen in der Zellkonzentration zueinander auch auf Konzentrationsunterschiede in der Aussaatdichte zurückzuführen sein. Anhand der Messwerte können keine eindeutigen Unterschiede in der Entwicklung der Zellkulturen auf den beschichteten sowie unbeschichteten Objektträgern der Struktur 1 festgestellt werden.

Struktur 2 - Rechteckstruktur

Die Rechteckstrukturen besitzen die Periode 200 μm , Linienbreite 45 μm - 50 μm und Tiefe 25-30 μm . Ein Teil der Rechteckstrukturen wurde mit einer 100 nm dicken ta-C Schicht beschichtet.

Aus den in Messung 1 detektierten Intensitäten kann für die beschichtete und unbeschichtete Struktur 2 keine eindeutige Zellkonzentration abgeleitet werden. Die detektierten Intensitäten befinden sich auch hier im Bereich der Eigenfluoreszenz des Mediums. Dies wird durch die geringe Ausgangskonzentrationen der Zellen in den Wells und der relativ langen Verdopplungsrate der Zelllinie SAOS-2 hervorgerufen. Die Messung 2 entspricht einer Kultivierung von 4 Tagen, in denen die Konzentration an SAOS-2 Zellen in den Wells aufgrund der spezifischen Verdopplungsrate ansteigt. Der leichte Anstieg der Intensität in Abbildung 13 verdeutlicht dies. Die für die beschichtete Struktur berechnete Zellkonzentration weicht um 14% von der unbeschichteten Struktur ab. Nach 7 Tagen Kultivierung, dies entspricht Messung 3, erfolgt eine annähernde Verdopplung der Zellkonzentration gegenüber der vorhergehenden Messung 2. Dies ist wieder auf die Verdopplungsrate der Zellkultur zurückzuführen. Die berechneten Zellkonzentrationen für den mit ta-C beschichteten Objektträger, fallen im Vergleich zum unbeschichteten Objektträger 5% geringer aus. Die Zellkonzentration der Struktur 2 fällt, verglichen mit der Referenzmessung um 6% geringer aus. Die Abweichungen in den Zellkonzentrationen zwischen den beschichteten und unbeschichteten Objektträgern, scheinen auch diesmal auf einen fördernden Einfluss durch eine ta-C Beschichtung der Struktur 2 hinzuweisen. Dennoch sind die Abweichungen gering und können nicht als eindeutige signifikante Unterschiede eingestuft werden. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Abweichungen in den Zellkonzentrationen untereinander und zur Referenzmessung durch den Versuchsaufbau hervorgerufen worden sind. Unter den gegebenen Möglichkeiten zur Bestimmung der Zellkonzentration und den daraus hergestellten Zellsuspensionen zur Kultivierung in den 4-Well-Platten, können die Ausgangskonzentrationen nur mit Abweichungen zueinander ermittelt bzw. hergestellt werden. Die Abweichung der Konzentrationen in den Ausgangszellkulturen verursacht wiederum Abweichungen in den gemessenen Intensitäten und erschwert die richtige Interpretation der Messwerte.

Struktur 3 - Punktstrukturen

Die Punktstrukturen besitzen einen Lochabstand in x-Richtung von 120 μm und einen Lochabstand in y-Richtung von 150 μm . Die Lochdurchmesser betragen 80 μm – 120 μm und wurden bis in eine Tiefe von 15-20 μm in die Oberfläche der Glasobjektträger eingebracht. Ein Teil der strukturierten Objektträgeroberfläche wurde mit einer 100 nm dicken ta-C Schicht beschichtet.

Für die Messung 1 werden annähernd die gleichen Zellkonzentrationen wie in den vorhergehenden Untersuchungen zur Struktur 1 und 2 ermittelt. Die Intensitäten können nicht von der Eigenfluoreszenz des Mediums differenziert werden und die daraus abgeleiteten Zellkonzentrationen sind nicht eindeutig. Die Anzahl an Zellen steigt ab Messung 2 in den Wells kontinuierlich an. Die Zellkonzentration für den beschichteten Objektträger fällt um 27% größer aus als die Zellkonzentration vom unbeschichteten Objektträger. Dies könnte durch die ta-C Beschichtung der Struktur 3 verursacht werden und positive Auswirkungen auf die Proliferation der Zelllinie haben. Durch den Prozess der Objektträgerstrukturierung und den gewählten Abmessungen der Punktstrukturen wurden auf dem Objektträger relativ häufig und in geringen Abständen die Oberflächenspannungen des Natron-Kalk-Glases verändert. Durch das Aufbringen der ta-C Beschichtung erfolgte für die beschichtete Teilstruktur eine Homogenisierung der Oberflächenrauheit und der Oberflächenspannung des Materials was sich in einer höheren Zellkonzentration und damit verbesserten Proliferation der Zelllinie nach 4 Tagen Kultivierung zeigen könnte. Die Messungen liefern jedoch keine eindeutigen Ergebnisse die signifikante Unterschiede zwischen der Kultivierung auf ta-C beschichteten und unbeschichteten Objektträger erkennen lassen. Die Unterschiede in den Ergebnissen könnten ebenfalls auf verschiedene Zellkonzentrationen in den Zellsuspensionen zurückzuführen sein. In Messung 3 resultiert der kontinuierliche Anstieg der Zellkonzentration in einer annähernden Verdopplung gegenüber der Messung 2. Für die Kultivierungszeit von 7 Tagen konnte durch die Untersuchung eine höhere Zellkonzentration von 13 % für die unbeschichtete Struktur 3 gegenüber der beschichteten Struktur festgestellt werden. Die höhere Zellkonzentration für die unbeschichtete Struktur würde nun, aufbauend auf die bisherige Interpretation, dafür sprechen, dass die ta-C Beschichtung einen

negativen Einfluss auf die Proliferation ausübt und steht damit im Widerspruch zu den bisherigen Ergebnissen. Die Interpretation der Daten erweist sich ebenfalls als schwierig, da nicht eindeutig ausgeschlossen werden kann, dass dieses Ergebnis ausschließlich auf die ta-C Beschichtung zurückzuführen ist. Die Fehleranfälligkeit der Messmethode wie zum Beispiel abweichende Zellkonzentrationen in der Suspensionslösungen, fehlerhafte Ablösung der Zellen von den Oberflächen etc. können dieses Ergebnis ebenso hervorbringen und die Abweichung von 13% verursachen.

Kontrolle

Ein unstrukturierter und unbeschichteter Glasobjektträger wurde als Referenzmessung parallel zu den strukturierten und beschichteten bzw. unbeschichteten Glasobjektträgern kultiviert. Die in Messung 1 detektierten Intensitäten befinden sich im Bereich der Eigenfluoreszenz des Mediums, die Anzahl an Zellen kann nicht eindeutig bestimmt werden. Die Messung 2 ergibt einen leichten Anstieg der Fluoreszenz, hervorgerufen durch die spezifische Verdopplungsrate der Zelllinie. Die Messung 3 ergibt eine annähernde Verdopplung der Intensität zur Messung 2 und die Veränderung erfolgt in den gleichen Größenordnungen wie die Vergleichsmessungen. Im gesamten Untersuchungszeitraum können für die unbeschichtete Referenzmessung höhere Zellkonzentrationen als für die strukturierten und /oder beschichteten Glasobjektträger nachgewiesen werden. Die Abweichungen in den Zellkonzentrationen der Referenzmessung zur Struktur 1 beträgt 3% mehr, zur Struktur 2 um 6% mehr und zur Struktur 3 um 3% mehr. Da dies auch für die unbeschichteten Strukturen aus den Messwerten hervorgeht, können die höheren Zellkonzentrationen der Referenzkultur nicht durch die fehlende ta-C Beschichtung verursacht werden. Die adhärierten Zellen werden durch die Form und Abmessungen der gewählten Strukturen in ihrer Proliferation und Spreitung gehindert. Auf den unstrukturierten Referenzmessungen können die Zellen vollständig spreiten und gegenseitig ausweichen wenn sie sich im Wachstum behindern. Der Zellzyklus kann ohne größere Störungen ablaufen und die Teilung der Zelle in Tochterzellen erfolgen

Auf den strukturierten Glasobjektträgern ist dies nur eingeschränkt möglich. Die Regulation des Zellzyklus erfolgt durch verschiedene Kontrollmechanismen. So wird die Zellteilung extern durch physiologische Parameter, wie zum Beispiel die Kontaktinhibition, eingeschränkt. Dies geschieht, sobald sich die Membranen benachbarter Zellen berühren und führt zur Unterbrechung des Zyklus und führt dadurch zu geringeren Zellkonzentrationen auf den strukturierten Objektträgern.

5.2 Charakterisierung der Proliferation mit der Software CellProfiler

Gegenstand dieses Abschnitts ist die Diskussion der in Kap. 4.2 vorgestellten Ergebnisse zum unter 3.2.2 beschriebenen Experiment. Die Identifizierung möglicher Einflussfaktoren auf die Proliferation der Zelllinie SAOS-2 durch verschieden strukturierte und/oder beschichtete Adhäsionsflächen stand im Fokus des Experiments. In den vorhergehenden Experimenten wurde die Fluoreszenz aller auf den untersuchten Substraten adhären Zellen mit dem Cell Titer Blue Assay bestimmt. Da diese Methode jedoch mit gewissen Ungenauigkeiten behaftet ist, zeigen die Ergebnisse eine relativ große Fehlerspanne und erschweren die eindeutige Identifizierung von Einflussfaktoren auf die Proliferation. Die Charakterisierung des Zellwachstums anhand morphologischer Parameter kann mit der digitalen Bildverarbeitungssoftware CellProfiler realisiert werden und ist Gegenstand dieses Abschnitts. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Anlage 4 in Form von Tabellen zusammengefasst. Die Fluoreszenzaufnahmen und segmentierten Bilder sind auf der beigelegten CD Rom enthalten.

Einfluss der Bildverarbeitung auf die Objektsegmentierung

Die Genauigkeit in der Identifizierung und Segmentierung von Objekten durch die DBV Software CellProfiler ist von der Bildqualität abhängig. Durch unterschiedliche Belichtungszeiten während der Aufnahme können Nuklei und Aktinfilamente, welche nur gering fluoreszieren, sichtbar gemacht werden. Anhand der fluoreszierenden Fläche erfolgt die Identifizierung und Vermessung von Objekten. Die fluoreszierende Fläche variiert in Abhängigkeit von der Belichtungszeit. Dies hat direkte Auswirkung auf die Messwerte. Durch längere Belichtungszeiten werden auch fluoreszierende Überreste von alten Zellen aus vorhergehenden Untersuchungen sichtbar, da die Objektträger wiederverwendet wurden und nach jeder Analyse von den Zellen gereinigt. Durch das Fixieren der Zellen mit Formaldehyd und die zur Ablösung der adhären Zellen verwendete Trypsinlösung konnten die Zytoskelette und Nuklei der Zellen nicht immer vollständig abgelöst und von den Objektträgern entfernt werden. Die Nuklei blieben zum großen Teil erhalten und beeinflussten die

Segmentierung und Vermessung von Objekten, da die neuen Zellen über die alten Zellen hinweg wuchsen, das Fluoreszenzsignal aber noch zu erkennen war.

Durch längere Belichtungszeiten treten Hintergrundstrukturen und störende Artefakte deutlicher in den Vordergrund. Diese Hintergrundstörungen werden fälschlicherweise als Objekte identifiziert und müssen durch Kalibrierung der Software aus den einzelnen Bildern entfernt werden. Dies hat wiederum Einfluss auf die Informationen im Bild. Die Kalibrierung erfolgte durch die Threshold-Anpassung. Je nach Bild wurde eine neue Pixelintensität in Abhängigkeit eines zuvor definierten Schwellenwertes für die Grauwerte definiert. Diese Pixel-Transformationen basieren auf dem Histogramm, welches die Häufigkeitsverteilung der Pixelwerte im Bild wiedergibt. Die örtliche Pixelposition bleibt dabei unberücksichtigt. Hintergrundstörungen in einem spezifischen Grauwertbereich können so aus den Bildern herausgefiltert werden. Dies trifft aber für das gesamte Bild zu. Werden den fluoreszierenden Zellen oder Nuklei die gleichen Grauwerte wie den Artefakten zugeordnet, so werden diese ebenfalls aus den Bildern entfernt. Die Bilder erscheinen mit reduziertem Rauschen und sind geglättet. Die Kantenschärfe des Ergebnisbildes wird reduziert, mit direktem Einfluss auf die Messwerte. Die Heterogenität des Bildes stellt einen weiteren Einflussfaktor auf die Bildanalyse dar. Durch unterschiedliche Ausleuchtung, Beleuchtungsgradienten innerhalb eines Bildes, Schattenwurf durch die Strukturen etc. entstehen unterschiedliche Helligkeits- und Farbintensitäten, die wiederum die Grauwerte verfälschen und zu einer ungenauen oder falschen Segmentierung von Objekten innerhalb der Strukturen führen können.

Einfluss der Objektsegmentierung auf die Ergebnisse der Analyse

Die Threshold-Anpassung ist ein Basismodul der Software CellProfiler und kann nicht nur zur Reduzierung von Artefakten und Hintergrundstrukturen verwendet werden. Durch Variation des Thresholdwertes lassen sich Objektintensitäten filtern. In Kombination mit der Identifizierung von primären Objekten, den Nuklei, werden im Graustufenbild Objekte segmentiert, die sich durch einen scharfen Kantenverlauf auszeichnen. Die Identifizierung von primären Objekten ist wiederum Grundlage der Segmentierung der sekundären Objekte, den Zellen. Wird der Schwellenwert des

Thresholdfaktors zu hoch eingestellt, erfolgt die Zerlegung der Nuklei in mehrere Teilobjekte mit direkter Auswirkung auf die sekundären Objekte. Diese werden ebenfalls in mehrere Teilobjekte zerlegt und die Ergebnisse bezüglich der morphologischen Parameter wie Formfaktor, MajorAxis und Area verfälscht. Der Schwellenwert muss für jedes Bild nachkalibriert und ein Kompromiss zwischen Schärfe der Kantensegmentierung und Zerlegung in Teilobjekte gefunden werden.

Die Kantenerkennung von zusammen liegenden Objekten erfolgt durch lokale und stark ausgeprägte Unterschiede der Grauwerte benachbarter Pixel im Graustufenbild (Kontrastunterschiede). Der lokale Kontrast im Graustufenbild, der durch die Struktur des Zytoskeletts hervorgerufen wird, kann ebenfalls zu einer falschen Kantenerkennung führen. Dies ist vermehrt bei dicht beieinander gewachsenen Zellen aufgetreten. Die Segmentierung und Abgrenzung von dicht beieinander und übereinander wachsenden Zellen wird durch Intensitätsverläufe im Graustufenbild realisiert. Die Fluoreszenzintensitäten können in diesen Zellclustern schwer voneinander differenziert werden. Dies verursacht einen segmentierten Kantenverlauf, der von der realen Form der Zellen und Nuklei abweicht und z.B. Zellen die sich in Zellteilung befinden oder Zellcluster bis zu einer bestimmten Größe als 1 Objekt identifiziert. Die Zuordnung der Outlines zu den Zellen wird erschwert und die Ergebnisse der Messungen werden beeinflusst.

Die Interpretation der Ergebnisse hinsichtlich fördernder oder hemmender Einflussfaktoren auf die Proliferation durch die gewählten Strukturen ist nicht vollständig möglich. Die Zellen sind auf den Plateaus und in die Zwischenstrukturen hineingewachsen bzw. an den Rändern der Strukturen entlang. Da die Aufnahme der Fluoreszenzbilder aus der Perspektive von oben erfolgte, sind die senkrechten Kanten der Strukturen nicht sichtbar und dort adhärierte Zellen können nicht vollständig durch die Software segmentiert und vermessen werden. Die Form der Strukturen beeinflusst ebenfalls die Spreitung der Zellen und begrenzt die Ausbreitung der Zellen zu ihrer vollständigen und endgültigen Form. Das Vermessen von Zellclustern, die in den Strukturen adhäriert und gewachsen sind, ist ebenfalls nur eingeschränkt möglich, da die Zellen übereinander wuchsen und sich gegenseitig behinderten bzw. die Fluoreszenzintensitäten sich überlagerten und nur schwer einzelnen Zellen zuzuordnen waren. Die genaue Vermessung der Objekte ist abhängig von scharf

dargestellten Nuklei und Zellen. Dies ist nur begrenzt mit dem Fluoreszenzmikroskop realisierbar. Die Zellen adhärten auf den Plateaus und in den tiefer gelegenen Zwischenräumen. Die Fluoreszenzaufnahmen können die Zellen und Nuklei nur in einer Tiefenebene scharf darstellen. Alle anderen Objekte sind mit einer Unschärfe im Bild dargestellt. Die Unschärfe ist als Koma (schweifartig ausgeprägte Umgebung des Objektes) in den Fluoreszenzbildern zu erkennen und wird durch die Software als abnehmendes Intensitätssignal interpretiert und vermessen, beeinflusst also ebenfalls die Messwerte.

Struktur 1 - Linienstrukturen

Die Mittelwerte der morphologischen Parameter der Zellen variieren für die beschichtete und unbeschichtete Teilstruktur 1 im gesamten Untersuchungszeitraum gleichmäßig.

Nach 24 Stunden Kultivierung weicht der Mittelwert $\text{MajorAxis}_{\text{Zellen}}$ der beschichteten Struktur ca. 2% vom Mittelwert der nichtbeschichteten Teilstruktur ab. Nach 4 Tagen Kultivierung ist ein leichter Anstieg des Mittelwerts $\text{MajorAxis}_{\text{Zellen}}$ registriert worden. Dies ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die steigende Zahl an Zellclustern in den Fluoreszenzaufnahmen zurückzuführen. Die Struktur 1 ist durch breite Stege und relativ schmale Vertiefungen charakterisiert. Bei Betrachtung der Fluoreszenzbilder fällt auf, dass die Zellen der Zellcluster überwiegend auf den langen und breiten Stegen der Struktur 1 adhärten. Die Spreitung und das Wachstum der Zellen unterliegen auf den Stegen keiner Beschränkung durch die Strukturen selbst. Dies zeigt sich wiederum in den höheren Mittelwerten der $\text{MajorAxis}_{\text{Zellen}}$. Dies wird auch durch die Messwerte für die Area der Zellen (Tabelle 9, Anhang 4) bestätigt. Die vermessene Fläche pro Zelle steigt in Messung 2 gegenüber den anderen Messungen an. Nach 7 Tagen Kultivierung verringern sich die Mittelwerte der $\text{MajorAxis}_{\text{Zellen}}$ und Area. Dies kann ebenfalls mit dem Zellwachstum erklärt werden. Nach 7 Tagen Kultivierung, dies entspricht drei Verdopplungszyklen, sind die Plateaus dicht bewachsen und die Zellen breiten sich in den schmalen und tiefer gelegenen Strukturzwischenräumen aus. In den Vertiefungen können die Zellen nicht vollständig spreiten und ausdehnen. Die segmentierten Zellen sind kleiner und die Mittelwerte nehmen ab. Durch die dichte Bewachsung auf den Plateaus bedrängen sich die Zellen

gegenseitig und wachsen in den Zellclustern übereinander. Die Segmentierung und Abgrenzung von dicht beieinander und übereinander wachsenden Zellen wird durch Intensitätsverläufe realisiert. Die überlagerten Intensitäten im Graustufenbild können nur schwer einzelnen Zellen in den Zellclustern zugeordnet und diese dadurch schwer voneinander differenziert werden. Die Aktin-Struktur des Zytoskeletts erzeugt im Graustufenbild unterschiedliche und lokal ausgeprägte Grauwerte von benachbarten Pixeln. Dieser lokale Kontrast kann eine Kantensegmentierung, die von der realen Form der Zellen abweicht, hervorrufen. Durch die Menge an analysierten Zellen in den Fluoreszenzbildern, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die verringerten Messwerte für die beschichtete und unbeschichtete Struktur 1 auf falsche Kantensegmentierung durch die Software zurückzuführen sind.

Aufgrund des Beobachtungswinkels kann eine Vermessung der Zellen, die an den Seitenwänden der Vertiefungen entlang wachsen, nicht korrekt stattfinden und die morphologischen Parameter dieser Zellen nicht in ihrer realen Größe erfasst werden. Die Strukturen sind bis in eine Tiefe von 15-20 μm in die Oberfläche eingebracht. Diese Tiefe entspricht einem Drittel der mittleren Länge der vollständig gespreiteten Zellen und wird durch die Software nicht vermessen, geht somit nicht in die Mittelwertbildung ein und beeinflusst das Endergebnis. Die Vermessung der Nuklei ergab im Untersuchungszeitraum von 7 Tagen einen kontinuierlichen Anstieg der Mittelwerte. Der Formfaktor beträgt 0,79 und stellt damit eine ovale bis fast kreisrunde Form dar. Dies kann auf den Fluoreszenzaufnahmen beobachtet werden. Die Form und Abmessungen der Strukturen beeinflussen das Wachstum der Nuklei nur in geringem Ausmaß. Dies spiegelt sich im kontinuierlichen Anstieg der Mittelwerte und kann mit den Abmessungen der Struktur 1 erklärt werden. Die längsten Achsen der Nuklei betragen zwischen 12 – 30 μm und fallen somit kleiner aus als die Abmessungen der Strukturen. Das Wachstum der Nuklei wird, im Gegensatz zu den Zellen, nicht durch die Form der Strukturen und Vertiefungen beeinflusst.

Struktur 2 - Rechteckstrukturen

Ähnlich der Struktur 1 variieren die morphologischen Parameter zwischen der beschichteten und unbeschichteten Teilstruktur im gesamten Untersuchungszeitraum gleichmäßig. Anhand dieser geringen Abweichungen untereinander, kann kein signifikanter Unterschied in der Adhäsion der Zellen zwischen der beschichteten und unbeschichteten Rechteckstruktur festgestellt werden.

Nach 24 Stunden Kultivierung sind die Zellen auf den beschichteten und unbeschichteten Oberflächen adhäriert. Es bildeten sich vereinzelte Zellcluster heraus die bevorzugt auf den Plateaus der Rechteckstrukturen adhärierten. Die in den Fluoreszenzaufnahmen sichtbaren Nuklei, welche in den Vertiefungen adhärierten, sind mit hoher Wahrscheinlichkeit Fragmente alte Zellen aus vorhergehenden Untersuchungen, die nicht vollständig von den Oberflächen abgelöst werden konnten. In dieser Situation erfolgte die manuelle Identifizierung der Objekte mit der Software CellProfiler. Es kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass dabei ausschließlich alte Zellen und Nuklei aus den Analysen entfernt worden.

Nach 4 Tagen Kultivierung, dies entspricht zwei Verdopplungszyklen, hat die Anzahl an adhärierten Zellen zugenommen. Dies wird zum einen durch die Zunahme und Vergrößerung der Zellcluster in den Fluoreszenzbildern erkennbar und zum anderen durch die Zunahme der Standardabweichung in den Diagrammen. Die Schwankungen der gemessenen Werte um den Mittelwert sind, für die segmentierten und vermessenen Zellen, stärker ausgeprägt. Die Mittelwerte der morphologischen Größen sind nach 4 Tagen Kultivierung leicht angestiegen. Die Zellen haben noch keine kritische Zelldichte erreicht und wachsen nebeneinander und homogen verteilt auf den Plateaus, die Spreitung und das Wachstum der Zellen wird nicht durch die Form und Abmessung der Struktur 2 beeinträchtigt. Dies wird durch die Messwerte der MajorAxis_{Zellen} bestätigt. Für die beschichtete und unbeschichtete Struktur wurde eine Zunahme der Mittelwerte registriert.

Nach 7 Tagen Kultivierung ist eine Verringerung der Mittelwerte für alle gemessenen Parameter zu erkennen. Die Zellen der Zellcluster haben eine kritische Größe erreicht und sind über die Kanten der Plateaus in die Vertiefungen hineingewachsen. Die in den Vertiefungen adhärierten Zellen werden durch die Form und Abmessungen der Struktur 2 in ihrer Spreitung und im Wachstum gehindert. Die Fluoreszenzaufnahmen

dieser Zellen sind unscharf abgebildet. Die Vertiefungen zwischen den Rechteckstrukturen wurden mit einem Femto- Sekunden Laser erzeugt. Der Abtrag des Materials erfolgte in zwei Schritten. Im ersten Schritt wurde eine Linienstruktur in der Oberfläche erzeugt. Im zweiten Schritt wurden die Objektträger um 90° gedreht und eine zweite Linienstruktur, die nun senkrecht zur ersten Linienstruktur verläuft, in die Oberfläche eingebracht. An den Punkten auf dem Objektträger, an dem sich die Linienstrukturen überkreuzten, erfolgte ein zweimaliger Materialabtrag, in dessen Folge sich diese Punkte durch eine größere Tiefe auszeichnen. Die scharfe Abbildung von Objekten in den Fluoreszenzaufnahmen gelingt immer nur für eine Ebene. Wurden in den Fluoreszenzaufnahme der Schärfefokus auf die Plateaus gelegt und die dort adhärennten Zellen scharf abgebildet, so erschienen die in den Vertiefungen adhärennten Zellen und Nuklei unscharf. Die Zellen, die in den sich überkreuzenden Linien adhärennten, also vom Schärfefokus noch weiter entfernt sind, konnten nur mit einer sehr stark ausgeprägten Unschärfe abgebildet werden. Die Unschärfe ist als Koma (schweifartig ausgeprägte Umgebung des Objektes) in den Fluoreszenzbildern zu erkennen. Werden die Zellen unscharf dargestellt, können keine eindeutigen Intensitätsverläufe und damit Grauwerte zugeordnet werden. Die eindeutige Abgrenzung von Objekten zu ihrer Umgebung und anderen Objekten wird beeinflusst und führt zu einer Kantenerkennung, die von der realen Struktur und Form des Zytoskeletts abweicht. Die Zellen werden als kleinere Objekte segmentiert. Dies zeigt sich wiederum in der Abnahme der Mittelwerte für alle gemessenen Parameter.

Struktur 3 - Punktstrukturen

Die Messwerte der Struktur 3 entwickeln sich analog zu den Messwerten der Struktur 1 und 2. Die Mittelwerte der vermessenen Größen variieren für die beschichtete und unbeschichtete Struktur im gesamten Untersuchungszeitraum gleichmäßig. Die Zellen adhärennten bevorzugt in den Punktstrukturen und bildeten dort Zellcluster aus. Die Form und Größe der Punktstrukturen beeinflussen die Spreitung der Zellen. In den Fluoreszenzaufnahmen sind alte Nuklei, die durch die Objektträgerreinigung nicht vollständig von der Oberfläche entfernt werden konnten, erkennbar. Diese sind von der Größe und Form her ähnlich den adhärennten Zellen. Durch die manuelle Objektauswahl mit der Software kann nicht vollständig sichergestellt werden, dass

die selektierten Objekte ausschließlich alte Zellen und Nuklei waren und diese aus der Analyse entfernt wurden. Dies liegt darin begründet, dass die Fluoreszenzintensitäten dieser Objekte nur schwer von den Intensitäten der neu adhärierten Zellen differenziert werden konnten. Aufgrund der beengten Form der Punktstrukturen adhärierten und wuchsen die neuen Zellen über die Überreste der alten Zellen hinweg, deren Fluoreszenz erhalten blieb.

Nach 4 Tagen Kultivierung ist die Mehrzahl der Punktstrukturen, in denen die Zellen adhärierten durch die gebildeten Zellcluster ausgefüllt. Die Zellen liegen in den Strukturen homogen verteilt und leicht gespreitet vor. Dies spiegelt sich in dem Anstieg der Messwerte gegenüber der vorhergehenden Messung wieder. Die vollständige Spreitung der Zellen wird jedoch durch die geometrische Form und die Abmessung der Strukturen beeinflusst. Die Zellen wachsen an den Rändern der Strukturen entlang und breiten sich auf den Plateaus aus. Nach 7 Tagen Kultivierung verringern sich die Messwerte der morphologischen Parameter der Zellen. Dies wurde auch schon bei den anderen Strukturen beobachtet und liegt in den gleichen Ursachen begründet. Die in den Punktstrukturen adhärierten Zellen beeinflussen sich im Wachstum und in der Spreitung. Die Zellen wachsen in den Zellclustern übereinander hinweg und bedrängen sich gegenseitig. Die Segmentierung und Abgrenzung von dicht beieinander und übereinander wachsenden Zellen wird durch Intensitätsverläufe realisiert. Die überlagerten Intensitäten im Graustufenbild können nur schwer einzelnen Zellen in den Zellclustern zugeordnet und diese dadurch schwer voneinander differenziert werden. Ein weiterer Einflussfaktor auf die Objektsegmentierung und die Vermessung der Zellen ist die Bildschärfe. Die scharfe Abbildung von Objekten in den Fluoreszenzaufnahmen gelingt immer nur für eine Ebene. Die Punktstrukturen reichen bis in eine Tiefe von 15-20 μm . Da die Zellen am Anfang der Experimente überwiegend in den Punktstrukturen adhärierten, wurde der Schärfefokus in den Fluoreszenzbildern so gewählt, dass diese Zellen scharf abgebildet werden. Die Zellen, die aus den Punktstrukturen herauswachsen, werden mit einer Unschärfe abgebildet, was wiederum die Segmentierung und Vermessung beeinflusst. Werden die Zellen unscharf dargestellt, können keine eindeutigen Intensitätsverläufe und damit Grauwerte zugeordnet werden. Die eindeutige Abgrenzung von Objekten zu ihrer Umgebung und anderen Objekten wird beeinflusst

und führt zu einer Kantenerkennung, die von der realen Struktur und Form des Zytoskeletts abweicht. Die Strukturen sind bis in eine Tiefe von 15-20 μm in die Oberfläche eingebracht. Die Aufnahme der Fluoreszenzbilder erfolgte aus der Perspektive von oben. Somit sind die senkrechten Kanten der Strukturen nicht sichtbar und dort adhärierte Zellen können nicht vollständig durch die Software segmentiert und vermessen werden. Die Zellen werden als kleinere Objekte segmentiert. Dies zeigt sich wiederum in der Abnahme der Mittelwerte für alle gemessenen Parameter.

Kontrolle

Die Mittelwerte der vermessenen morphologischen Größen vielen im gesamten Untersuchungszeitraum für den mit ta-C beschichteten Teil des Glasobjektträgers größer aus.

Die Adhäsion der Zellen ist auf dem beschichteten und unbeschichteten Teil des Glasobjektträgers nach 24 Stunden beendet. In 20 Fluoreszenzbildern des beschichteten Teilobjektträgers wurden 318 Objekte identifiziert, von diesen wurden 235 Objekte analysiert und mit den identifizierten Objekten des nichtbeschichteten Teils des Objektträgers verglichen. Die größere Anzahl an Zellen für den beschichteten Teil des Objektträgers ist wahrscheinlich auf unterschiedliche Zellkonzentrationen in den Suspensionslösungen zur Aussaat auf den Objektträgern zurückzuführen. Auf dem beschichteten Teil bildeten sich keine Zellcluster aus. Die Zellen auf dem unbeschichteten Teil des Objektträgers haben sich zu vereinzelter Zellclustern zusammengeschlossen. Die Objektträger der Referenzmessung besitzen keine Strukturen und somit eine Oberflächentopographie, die die scharfe Abbildung der Objekte in den Fluoreszenzbildern nicht beeinflusst. Die Zellen adhärierten alle in einer Ebene und konnten durch das Fluoreszenzmikroskop relativ scharf abgebildet werden. Die Zellen sind vor dunklem Hintergrund abgebildet und eine eindeutige Kantensegmentierung konnte durch die Software erfolgen.

Nach 4 Tagen Kultivierung, dies entspricht zwei Verdopplungszyklen, ist eine geringe Zunahme der Mittelwerte für die auf dem beschichteten und unbeschichteten Teil des Objektträgers adhärierten Zellen registriert worden. Dies kann mit dem Anstieg der Anzahl an Zellen auf dem Objektträger erklärt werden. Es wurden 477 Zellen

jeweils für den beschichteten und unbeschichteten Teil des Objektträgers vermessen. Die Zellen sind auf den Oberflächen vollständig adhärent und gespreitet und die Zellcluster haben noch nicht die Größe erreicht, in denen die einzelnen Zellen schwer voneinander differenziert werden können.

Nach 7 Tagen ist ähnlich den vorhergehenden Untersuchungen eine leichte Verringerung der Mittelwerte registriert worden. Auf den Objektträgern sind die Zellen nach drei Verdopplungszyklen homogen und dicht zu Zellclustern zusammengewachsen. In diesen Zellclustern behindern die Zellen sich gegenseitig im Wachstum und in der Spreitung. Auf den Fluoreszenzaufnahmen ist zu erkennen, dass die Zellen im Randbereich eine größere Fläche einnehmen als im Zentrum der Cluster, dort wachsen die Zellen übereinander hinweg. Die Segmentierung von übereinander wachsenden Zellen wird durch Intensitätsverläufe im Graustufenbild realisiert. Die überlagerten Intensitäten können schwer einzelnen Zellen in den Zellclustern zugeordnet und diese dadurch voneinander differenziert werden. Die Zellen werden als kleinere Objekte segmentiert. Dies zeigt sich wiederum in der Abnahme der Mittelwerte für alle gemessenen Parameter.

Anhand der Kontrollmessungen, in der die Kultivierung der Zelllinie SAOS-2 auf einem beschichteten und unbeschichteten Glasobjektträger durchgeführt wurde, kann im Untersuchungszeitraum von 7 Tagen eine bessere Spreitung der Zellen für den mit ta-C beschichteten Teil des Objektträgers festgestellt werden. Dies wird durch die Messwerte für die MajorAxis_{Zellen}, den Formfaktor und der vermessenen Fläche (Area) bestätigt. Der Formfaktor = 1 entspricht einem perfekt kreisförmigen Objekt. Für die auf dem mit ta-C beschichteten Teil adhärennten Zellen fällt der Formfaktor kleiner aus als für den nichtbeschichtete Teil des Objektträgers. Daraus kann abgeleitet werden, dass die Zellen auf der beschichteten Oberfläche eine weniger kreisförmige Form besitzen und besser gespreitet vorliegen. Die bessere Spreitung wird auch durch die Messwerte der Area bestätigt. Die Messwerte der Area geben die durch die Zellen eingenommene Fläche an. Im Untersuchungszeitraum wurden nach 24 Stunden, 4 Tagen und 7 Tagen jeweils höhere Messwerte für die beschichtete Oberfläche festgestellt. Der Prozess der Spreitung und Adhäsionsvorgang von Zellen wird durch auf den Substratoberflächen adsorbierten Proteinen gesteuert. Die Adsorption von Proteinen auf Oberflächen ist stark von den

hydrophilen oder hydrophoben Eigenschaften des Substrates abhängig. Proteine, die die Adhäsion von Zellen unterstützen adsorbieren bevorzugt auf hydrophilen Oberflächen. Die hydrophoben oder hydrophilen Eigenschaften einer Substratoberfläche können durch die Angabe eines Kontaktwinkels zwischen Wasser und Substrat charakterisiert werden. Bei hydrophilen Oberflächen ist der Kontaktwinkel zwischen Wasser und Substrat kleiner als 90° . Die Kultivierung erfolgte auf den aus Natron- Kalk Glas bestehenden Objektträgern, von denen ein Teil mit einer ta-C Beschichtung versehen wurde. Beide Materialien besitzen hydrophobe Eigenschaften und unterstützen die Proteinadsorption und den Adhäsionsvorgang der Zellen in nur geringem Umfang. Die Messwerte legen nahe, dass die Adhäsion und Spreitung der Zellen durch die ta-C Beschichtung besser unterstützt wurde als auf dem aus Natron-Kalk Glas bestehenden Objektträger. Der Kontaktwinkel von Wasser auf abgeschiedenen ta-C Schichten beträgt zwischen 75° und 80° [45]. Ein weiterer Einflussfaktor auf die Adsorption von Proteinen ist die Topographie der Werkstoffoberfläche. Durch die Rauheit wird die Oberfläche der Adhäsionsfläche vergrößert. Die vermehrte Anzahl an Oberflächendefekten wie z.B. Fehlstellen etc. vergrößert die Wahrscheinlichkeit der Proteinanlagerung an diesen Orten und erhöht die katalytische Wirkung der Oberfläche und unterstützt die Zelladhäsion und Spreitung. Die Oberflächenrauheit der ta-C Schicht und des unbeschichteten Glasobjektträgers wurden mit dem Oberflächenprofilometer DEKTAK 3030 bestimmt. Die Oberflächenrauheit des Glasobjektträgers beträgt ca. 5 nm und die Oberflächenrauheit der ta-C Beschichtung beträgt ca. 10 nm. Die verbesserte Adhäsion und Spreitung der Zellen auf dem mit ta-C beschichteten Teil des Objektträgers ist wahrscheinlich auf die größere Oberflächenrauigkeit der ta-C Schicht gegenüber der des Natron-Kalk Glases zurückzuführen. Ein Indiz dafür sind die Randbereiche der beschichteten Teilstruktur. Die Beschichtung in den Randbereichen ist wahrscheinlich durch die mehrmalige Wiederverwendung der Objektträger aufgeplatzt und rissig geworden. Diese Bereiche wurden für die Analysen nicht verwendet, in den Fluoreszenzaufnahmen war aber eine deutliche Zunahme der Anzahl an adhärenierten Zellen in diesen Bereichen zu erkennen.

5.3 Ausblick

Die Untersuchungen belegen eine verbesserte Adhäsion und Spreitung der Zellen auf den mit ta-C beschichteten Objektträgern. Durch die verwendeten Strukturen konnte das Zellwachstum und die Proliferation beeinflusst werden. Jedoch konnten aufgrund der einmalig durchgeführten Experimente keine signifikanten Merkmale aus den Ergebnissen gewonnen werden. Die Experimente müssten unter identischen Bedingungen mehrmals wiederholt und die Ergebnisse in statistischen Zusammenhang gebracht werden, um Einflussfaktoren einer ta-C Beschichtung auf die Proliferation der Zelllinie SAOS-2 zu identifizieren. Die Software CellProfiler ist dabei ein optimales Werkzeug und kann aufgrund der vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten auch in weiterführenden Experimenten zum Einsatz kommen. Die weiterführenden Untersuchungen könnten in der Bestimmung der Kontaktwinkel und Oberflächenspannungen sowie Oberflächenrauheiten durch AFM (atomic force microscopy) von strukturierten und beschichteten Substraten bestehen. Aus den gewonnenen Ergebnissen kann die Charakterisierung des Adhäsionsverhaltens für hydrophobe/hydrophile Oberflächen erfolgen. Mit dem Ziel der Biomaterialforschung, die Verträglichkeit an den Grenzflächen zwischen organischem Gewebe und nichtorganischen Materialien zu verbessern und die mechanischen Eigenschaften und die Funktionalität des Implantats bestmöglich nutzen zu können, spricht vieles für die weitere Erforschung der Einsatzmöglichkeiten für ta-C-Beschichtungen. So ist zum Beispiel die Kombination von ta-C Beschichtungen mit Titanlegierungen denkbar. Aufgrund der guten Biokompatibilität von sowohl Titan, als auch ta-C und dem deutlich geringeren Reib- und Verschleißkoeffizienten von ta-C könnte dies eine sehr gute Alternative zu den bisher in der Medizin verwendeten Implantaten darstellen.

6 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Masterarbeit wurden Osteosarkoma-Zellen auf mikrostrukturierten und ta-C beschichteten Glasobjektträgern 7 Tage im Brutschrank kultiviert. Die Identifizierung möglicher Einflussfaktoren auf die Proliferation und Adhäsion der Zelllinie durch mikrostrukturierte und/oder beschichtete Glasobjektträger steht im Mittelpunkt der Untersuchungen. Die auf den Objektträgern adhärenen Zellen wurden mit dem Cell Titer Blue Assay untersucht. Mit Hilfe des Cell Titer Blue Assays konnten höhere Zellkonzentrationen auf den Referenzobjektträgern nachgewiesen werden, auf welchen die Zellen in ihrer Proliferation nicht durch die Form der Strukturen gehindert wurden.

Die Software CellProfiler wurde zur Bestimmung der Fluoreszenzintensität und Anzahl der Zellen sowie zur Vermessung einzelner Zellen und Zellcluster genutzt. Durch die Fluoreszenzmikroskopie und anschließende Analyse mit der Software CellProfiler konnten die auf den strukturierten und/oder beschichteten Objektträgern adhärenen Zellen segmentiert und anhand morphologischer Größen vermessen werden. Dabei zeigt sich, dass die Form der Strukturen auf dem Glasobjektträger die Spreitung der Zellen beeinflusst: die durchschnittliche Länge der Zellen verringert sich mit den kleiner werdenden Strukturen. Die Messwerte belegen eine verbesserte Adhäsion und Spreitung der Zellen auf der mit ta-C beschichteten Teilstruktur gegenüber den aus Natron-Kalk Glas bestehenden strukturierten Objektträgern. Abschließend kann gesagt werden, dass die, durch die Strukturierung hervorgerufene schlechtere Zellproliferation, durch eine anschließende Beschichtung mit ta-C wieder deutlich verbessert werden kann. Somit kommt eine ta-C-Beschichtung überall da in Frage, wo eine Verbesserung des Reib- und Verschleißkoeffizienten und auch eine Strukturierung von Oberflächen gewünscht ist.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1]. **Wintermantel, E und Ha, S.** *Medizintechnik Life Science Engineering. - 5.überarbeitete und erweiterte Auflage.* Heidelberg : Springer Verlag, 2009. 978-3540939351.
- [2]. **Schmidt, R, Lang, F. und Thews, G.** *Physiologie des Menschen. - 31.vollständig neu bearbeitete und aktualisierte Auflage.* Berlin : Springer Verlag, 2010. 978-3-642-01650-9.
- [3]. **Karp, G.** *Molekulare Zellbiologie. - 1.deutsche Auflage.* Berlin : Springer Verlag, 2009. 978-3540238577.
- [4]. **Clark, D.P. und Pazdernik, N.J.** *Molekulare Biotechnologie- Grundlagen und Anwendung.* Burlington, MA01803, USA : Spektrum Akademischer Verlag, 2009. 978-8274-2128-9.
- [5]. **Ganten, D. und Ruckpaul, K.** *Grundlagen der Molekularen Medizin.* Heidelberg : Springer Medizin Verlag, 2008. 13 978-540-69412-0.
- [6]. **Schmitz, S.** *Der Experimentator: Zellkultur.- 1.Auflage.* s.l. : Spektrum Akademischer Verlag, 2007. 978-3827421081.
- [7]. **Bevilacqua M., Butcher E., Furie B.** Selectins: a family of adhesion receptors. *Cell.* 1991, Bd. 67, 2.
- [8]. **Takeichi, M.** Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion. *Annual Review of Biochemistry.* 1990, Bd. 59.
- [9]. **Narayan, R.** *Biomedical Materials.* Chapel Hill, NC 27599-1175 : Springer Verlag, 2009. 978-0-387-84871-6.
- [10]. **Keselowsky, B. G., Collard, D. M. und García, A. J.** Surface chemistry modulates fibronectin conformation and directs integrin binding and specificity to control cell adhesion. *Journal of biomedical materials research.* 66, 2003, Bd. A, 2.
- [11]. **Keselowsky, B. G., Collard, D. M. und Garcia, A. J.** Surface chemistry modulates focal adhesion composition and signaling through changes in integrin binding. *Biomaterials.* 2004, Bd. 25, 28.
- [12]. **Takhistov, P.** Electrochemical synthesis and impedance characterization of nano-patterned. *Biosensors & bioelectronics.* 2004, Bd. 19, 11.
- [13]. **Lindl, T.** *Zell- und Gewebekultur- Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen.* Heidelberg : Spektrum Akademischer Verlag, 2002. ISBN 3-8274-1194-7.
- [14]. **Ratner, B.S.,Hoffman,A.S., Schoen,F.J.** *Biomaterials Science - An Introduction to Materials in Medicine.* New York : Academic Press, 1996. 0-12-582461-0.
- [15]. **Meschede, D.** *Gerthsen Physik.* Heidelberg : Springer, 2010. 978-3-642-12893-6.
- [16]. **Guy, A.G.** *Essentials of Materials Science.* New York : McGraw-Hill,Inc., 1976. 007025351X.
- [17]. **Gardner, S.** Wikipedia. *Wikimedia Foundation Inc.* [Online] [Zitat vom: 28. 11 2011.] <http://de.wikipedia.org/wiki/Kohlenstoff>.
- [18]. **(VDI), Verein Deutscher Ingenieure.** VDI - Handbuch Werkstofftechnik . *Kohlenstoffsichten - Grundlagen, Schichttypen und Eigenschaften.* Berlin : Beuth Verlag, 2005. Bd. Teil 3, VDI 2840.
- [19]. **Gardner, S.** Wikipedia. *Wikimedia Foundation Inc.* [Online] [Zitat vom: 15. 03 2012.] http://de.wikipedia.org/wiki/Datei:Graphit_gitter.png.
- [20]. **Zhang, X.** Wear performance of tetrahedral amorphous carbon films prepared by filtered cathodic vacuum arc technique. *Surface and Coatings Technology.* 2002, Bd. 161, 2-3, S. 120-124.
- [21]. **Ronkainen, H.** *Tribological properties of hydrogenated and hydrogen-free diamon-like carbon coatings.* Espoo : Technical Research Center of Finland, 2001.
- [22]. **Drost, H.** *Plasmachemie.* Berlin : Akademie Verlag, 1978.
- [23]. **Boening, H. V.** *Plasma science and technology.* New York : Cornell University Press, 1982.
- [24]. **Poprawe, R.** *Lasertechnik für die Fertigung - Grundlagen, Perspektiven und Beispiele für den innovativen Ingenieur.* Berlin : Springer, 2005. 3-540-21406-2.
- [25]. **Ritwik, Kumar Roy und Kwanf-Ryeol, Lee.** Biomedical Applications of Diamon-Like Carbon Coatings:A Review. *Journal of biomedical materials research. Part B: Applied biomaterials.* 2007, Bde. 83-B, 1.

- [26]. **Gutensohn, K., et al.** In vitro analysis of diamond-like carbon coated stents: Reduction of metal ion release, platelet activation and thrombogenicity. *Thrombosis Research*. 2000, Bd. 99, 6.
- [27]. **Gillespie, WL, Frampton, CMA und Henderson, RJ.** The incidence of cancer following total hip replacement. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*. 1988, Bde. 78-B, 4.
- [28]. **Yu, L. J., Wang, X. und Wang, X. H.** Haemocompatibility of tetrahedral amorphous carbon films. *Surface and Coatings Technology*. 2000, Bde. 128-129.
- [29]. **Dion, I., Roques, X. und Baquey, Ch.** Hemocompatibility of Diamond-like Carbon coating. *Biomedical Materials and Engineering*. 1993, Bd. 3, 1.
- [30]. **Leng, Y. X., Chen, J. Y. und Yang, P.** Mechanical properties and platelet adhesion behavior of diamond-like carbon films synthesized by pulsed vacuum arc plasma deposition. *Surface Science*. 2003, Bd. 531, 2.
- [31]. **Jones, M. I., McColl, I. R. und Grant, D. M.** Protein adsorption and platelet attachment and activation, on TiN, TiC, and DLC coatings on titanium for cardiovascular applications. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2000, Bd. 52, 2.
- [32]. **Dithmar, S und Holz, F.G.** *Fluoreszenzangiographie in der Augenheilkunde.- 1. Auflage.* Heidelberg : Springer Verlag, 2008. 978-3540352235.
- [33]. Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. *DSMZ*. [Online] Neonaut GmbH. [Zitat vom: 28. November 2011.] <http://www.dsmz.de>.
- [34]. Paul Marienfeld GmbH & Co. KG . *marienfeld-superior*. [Online] Felix Seibert-Daiker, 22. 11 2011. [Zitat vom: 28. März 2011.] <http://www.marienfeld-superior.com//index.php/objekttraeger/articles/objekttraegerstaerke-ca-1-mm.html>.
- [35]. Thermo Fisher Scientific. *Fisher Scientific Part of Thermo Fisher Scientific*. [Online] Fisher Scientific GmbH, 2010. [Zitat vom: 27. März 2012.] https://webshop.fishersci.com/webfiles/de/documents/Brand_Zaehlkammern_u_Faerbezube_hoer.pdf.
- [36]. promega. *Promega Corporation*. [Online] [Zitat vom: 28. November 2011.] <http://www.promega.com>.
- [37]. Thermo Fisher Scientific. *thermoscientific*. [Online] Fisher Scientific GmbH, 10. März 2010. <http://www.thermoscientific.com>.
- [38]. **Lang, G.** *Histotechnik - Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik*. Wien : Springer Verlag, 2006. 10 3-211-33141-7.
- [39]. **Hammer, F.** Digitale Bibliothek der Universität Marburg. [Online] Philipps-Universität Marburg, 08. 02 2010. [Zitat vom: 11. 05 2012.] http://archiv.ub.uni-marburg.de/diss/z1998/0089/html/1_1.htm.
- [40]. Life technologies. *invitrogen*. [Online] 2012. [Zitat vom: 12. 06 2012.] <http://products.invitrogen.com:80/ivgn/de/DE/adirect/invitrogen?cmd=catProductDetail&productID=B607>.
- [41]. Life technologies. *Life technologies*. [Online] 2012. [Zitat vom: 12. 06 2012.] <http://products.invitrogen.com:80/ivgn/de/DE/adirect/invitrogen?cmd=catProductDetail&productID=H3569>.
- [42]. **Misselwitz, B., Strittmatter, G. und Periaswamy, B.** Enhanced CellClassifier: a multi-class classification tool for microscopy images. *BMC Bioinformatics*. 2010, Bd. 11, 30.
- [43]. **Carpenter, A. E., Jones, T. R. und Lamprecht, M. R.** CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome Biology*. 2006, Bd. 7, 10.
- [44]. **Kramme, R.** *Medizintechnik: Verfahren - Systeme - Informationsverarbeitung*. 4., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage. Heidelberg : Springer Verlag, 2011. 978-3-642-16186-5.
- [45]. **Chen, J. S., Lau, S. P. und Sun, Z.** Metal-containing amorphous carbon films for hydrophobic application. *Thin Solid Films*. 2001, Bde. 398-399.

Anlage 1: Ergebnisse Fluoreszenzmessung mit Fluoreszenzphotometer FluoroskanFL und berechnete Zellkonzentration zum Erstellen der Standardkurve der SAOS-2 Zelllinie im Untersuchungszeitraum von 7 Tagen

Messung	Kultivierung auf Kunststoff		Kultivierung auf Glas		Anzahl an Zellen auf Kunststoff	Anzahl an Zellen auf Glas
	Fluoreszenz	STDW	Fluoreszenz	STDW	Zellen/ Well	Zellen/ Well
0	8,00	0	8,00	0	1,00E+05	1,00E+05
1	11,67	0,43	11,81	0,51	3,05E+05	1,64E+05
2	15,21	0,46	15,20	0,80	1,88E+05	1,88E+05
3	20,60	0,68	19,70	1,06	3,28E+05	2,34E+05
4	28,82	1,04	25,92	1,39	4,45E+05	3,75E+05
5	45,24	1,66	37,62	1,86	4,92E+05	4,92E+05
6	64,40	2,08	54,64	2,34	8,20E+05	5,63E+05
7	96,54	3,43	76,62	3,37	9,84E+05	8,20E+05

Kultivierung SAOS-2 - 7 Tage

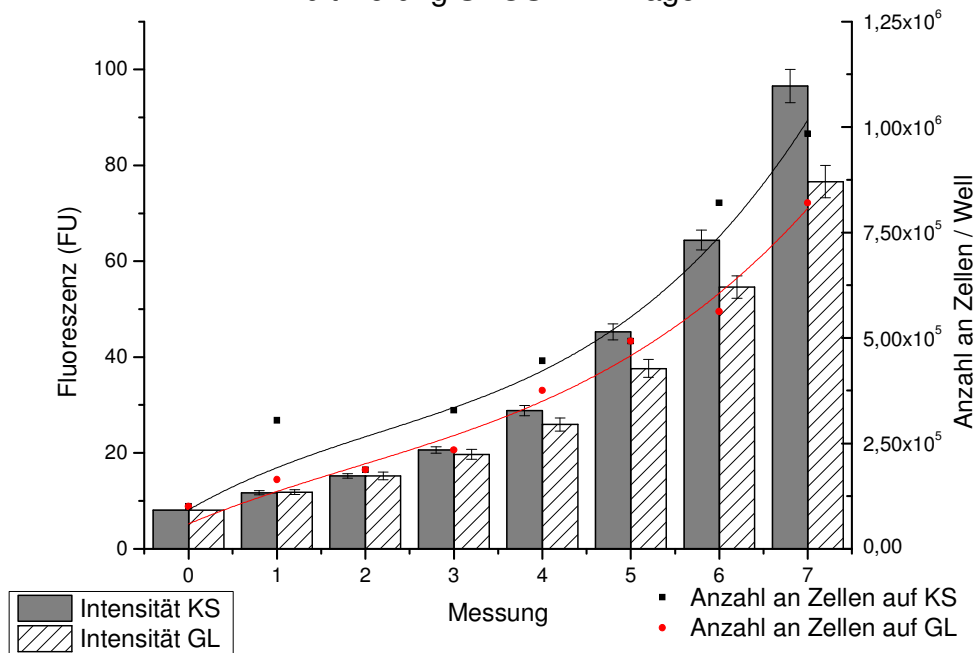


Abbildung 22: Fluoreszenzmessungen und berechnete Zellkonzentration im Untersuchungszeitraum von 7 Tagen für die aus Kunststoff (KS) oder Glas (GL) bestehenden Adhäsionsflächen.

Anlage 2: Ergebnisse der Fluoreszenzmessung mit dem Fluoreszenzphotometer FluoroskanFL von strukturierten und teilbeschichteten Glasobjektträgern in FU

Struktur	Messung	unbeschichtet			beschichtet		
		Fluoreszenz	STDW	Zellkonzentration	Fluoreszenz	STDW	Zellkonzentration
Struktur 1	1	7,83	0,51	1,30E+05	7,76	0,50	1,29E+05
	2	10,57	0,67	1,63E+05	11,52	0,70	1,74E+05
	3	21,41	1,53	2,85E+05	23,01	1,13	3,01E+05
Struktur 2	1	7,85	0,62	1,30E+05	8,09	0,65	1,33E+05
	2	10,44	0,88	1,62E+05	12,63	0,51	1,88E+05
	3	22,26	1,13	2,93E+05	21,04	1,63	2,81E+05
Struktur 3	1	8,03	0,50	1,33E+05	7,95	0,39	1,32E+05
	2	7,69	0,52	1,29E+05	11,50	0,72	1,74E+05
	3	25,37	1,68	3,26E+05	20,18	1,20	2,71E+05
Kontrolle	1	8,07	0,35	1,34E+05	--	--	--
	2	12,21	0,81	1,81E+05	--	--	--
	3	26,13	1,29	3,34E+05	--	--	--

Anlage 3: Verwendete Pipeline zur Analyse der Fluoreszenzbilder mit der Software Cellprofiler

Modul	Modulbeschreibung
Load Images	Fluoreszenzbilder (Nuklei und Aktin) werden geladen und mit Metadata verknüpft
Resize	Auflösung und Größe der Bilder werden um Faktor 1/4 reduziert
ColorToGray	konvertiert Farbbild (Fluoreszenzaufnahmen Grün und Blau) in grauskalierte Bilder (Channel1, Channel2)
RescaleIntensity	Berechnet die Pixelintensität, anhand eines aus dem Grauerthistogramm abgeleiteten Mittelwerts neu. Verbessert Segmentierung von Objekten
Crop	Zerlegt Graustufenbilder anhand geometrischer Formen wie Dreiecke, Rechtecke, Ellipsen. Ermöglicht das Vermessen von gekrümmten Flächen
IdentifyPrimary Objects	Identifiziert primäre Objekte (Nuklei) in grauskalierten Bildern, die als helle Objekte vor dunklem Hintergrund erscheinen
ApplyThreshold	Definiert neue Pixelintensität in Abhängigkeit eines zuvor definierten Schwellenwertes, ermöglicht herausfiltern von Hintergrundstörungen
ConserveMemory	Löscht alle bisher erstellten Bilder und leert Speicher, erhöht die Geschwindigkeit der Analyse
EnhanceEdges	Identifiziert und verstärkt Grenzen (Outlines) von Objekten zur leichteren Identifizierung und Segmentierung
ReassignObject Numbers	Vereint zu kleine Objekte, zu einem großen Objekt, ermöglicht genauere Segmentierung von sekundären Objekten
IdentifySecondary Objects	Identifiziert sekundäre Objekte (Zellgrenzen) basierend auf zuvor identifizierten primären Objekten
EditObjectsManually	Ermöglicht die manuelle Objektauswahl (Nuklei) aus denen die sekundären Objekte abgeleitet werden
MeasureImageArea Occupied	Misst die totale Fläche in einem Bild, die durch Objekte belegt ist.
MeasureObjectSize Shape	Misst mehrere Flächen- und Formmerkmale der identifizierten Objekte.
ExportToSpread Sheet	Exportiert Messungen für Visualisierung und statistische Auswertung
OverlayOutlines	Stellt die Outlines der mit dem Identify-Modul gefunden Objekte im Bild dar
DisplayDataOn Image	Ordnet allen identifizierten Objekten eine Nummer zu und stellt die Zahlen im Bild dar
SaveImages	Speichert Bilder im Output-Ordner ab und konvertiert *.bmp Format in *.tiff Format

Anlage 4: Ergebnisse CellProfiler für segmentierte Zellen und Nuklei**Tabelle 8:** Ergebnisse Formfaktor

Struktur	Messung	Nuklei				Zellen			
		beschichtet		unbeschichtet		beschichtet		unbeschichtet	
		Formfaktor	STDW	Formfaktor	STDW	Formfaktor	STDW	Formfaktor	STDW
Struktur 1	1	0,82	0,09	0,75	0,14	0,51	0,15	0,53	0,17
	2	0,79	0,11	0,75	0,12	0,52	0,13	0,47	0,15
	3	0,78	0,11	0,73	0,14	0,51	0,14	0,54	0,11
Struktur 2	1	0,82	0,09	0,75	0,14	0,51	0,15	0,53	0,17
	2	0,79	0,11	0,75	0,12	0,52	0,13	0,47	0,15
	3	0,78	0,11	0,73	0,14	0,51	0,14	0,54	0,11
Struktur 3	1	0,76	0,13	0,74	0,13	0,59	0,16	0,46	0,15
	2	0,81	0,10	0,73	0,13	0,56	0,12	0,45	0,14
	3	0,82	0,09	0,71	0,13	0,49	0,16	0,49	0,12
Kontrolle	1	0,78	0,11	0,78	0,13	0,50	0,16	0,58	0,12
	2	0,80	0,09	0,79	0,10	0,48	0,13	0,53	0,12
	3	0,80	0,08	0,79	0,09	0,42	0,13	0,59	0,11

Tabelle 9: Ergebnisse Area

Struktur	Messung	Nuklei				Zellen			
		beschichtet		unbeschichtet		beschichtet		unbeschichtet	
		AREA	STDW	AREA	STDW	AREA	STDW	AREA	STDW
Struktur 1	1	190,63	100,58	184,82	114,97	1138,50	479,29	1246,04	616,15
	2	213,00	127,96	228,91	133,92	1558,20	752,68	1384,82	575,71
	3	283,10	151,54	361,48	168,97	1133,93	512,50	1312,46	512,59
Struktur 2	1	266,28	116,09	293,54	242,65	1272,08	525,78	1250,30	698,60
	2	358,80	188,07	396,76	223,46	1599,25	746,14	1341,72	563,67
	3	292,65	174,60	276,11	185,15	1187,53	471,10	1139,30	462,82
Struktur 3	1	235,17	152,09	254,10	134,53	908,17	365,00	956,38	438,18
	2	253,89	107,74	326,39	153,49	1167,38	501,89	1057,73	453,46
	3	215,76	110,82	328,65	156,70	983,81	448,97	827,46	394,60
Kontrolle	1	410,75	170,19	345,96	165,43	1294,80	488,34	1199,95	460,63
	2	418,38	197,15	412,29	212,31	1725,89	813,50	1503,77	636,46
	3	381,60	130,43	412,14	150,09	1456,97	540,45	1272,76	581,76

Danksagung

Ein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. rer. nat. Petra Radehaus, die mir das Masterthema bereitgestellt und mich während der Bearbeitung sehr unterstützt hat.

Desweiteren möchte ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. Steffen Weißmantel für die gute Betreuung und Unterstützung in der Umsetzung danken.

Meinen außerordentlichen Dank möchte ich Frau Dipl. Ing. (FH) Anne-Christin Teichmann für die sehr gute und persönliche Betreuung während der Durchführung der Forschungs- und Entwicklungsmodule und der gesamten Zeit des Masterstudiums aussprechen. Die praktische Unterstützung in der Zellkultur, die zahlreichen Hinweise, Anregungen und Verbesserungen haben mir sehr geholfen.

Auch möchte ich den Kolleginnen und Kollegen der Fachgruppe Biotechnologie für die vielseitigen Anregungen und Hinweise während der gesamten Arbeit und für das angenehme Arbeitsklima danken.

Nicht zuletzt gilt ein besonders herzlicher Dank meiner Familie, die mich während meines Studiums in jeglicher Hinsicht unterstützt hat und immer für mich da ist.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Mittweida, den 31.07.2012

Steve Behrens